

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

CERNÁK ISTVÁN

KESZTHELY

2008

PANNON EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
Növénytudományi és Biotechnológia Tanszék

Növénytermesztés és Kertészeti Tudományok Doktori Iskola

Iskolavezető:

Dr. Gáborjányi Richard
Egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető:

Dr. Taller János
Tudományos főmunkatárs

***A Solanum stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus (PVY) extrém
rezisztencia gén (*Ry_{sto}*) markerezése**

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Készítette:

Cernák István

Készthely

2008

**A *Solanum stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus (PVY) extrém rezisztencia gén (*Ry_{sto}*)
markerezése**

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:
Cernák István

Készült a Pannon Egyetem Növénytermesztés és Kertészeti tudományok Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Taller János

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton % -ot ért el,

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

.....
(aláírás)

Bíráló neve:) igen /nem

.....
(aláírás)

***Bíráló neve:) igen /nem

.....
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján% - ot ért el

Veszprém/Keszthely,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDT elnöke

*** esetleges

KIVONAT

Hazánkban a burgonyatermesztésre legnagyobb kockázatot jelentő burgonya Y vírus (PVY) kártételét – leghatékonyabban – a vírusra rezisztens fajták előállításával és használatával csökkenthetjük. A jelen kutatási programban ezért célul tűztük ki a keszthelyi fajtákra jellemző *Solanum stoloniferum* eredetű PVY extrém rezisztencia gén (Ry_{sto}) markerezését, térképezését valamint egy, a rezisztens fajták nemesítését segítő DNS-markerekre alapozott szelekció rendszer kidolgozást.

A vizsgálatokat 195 F_1 tetraploid genotípust tartalmazó populáción végeztük, melyek a fertőzési és szerológiai tesztek során - a Ry_{sto} génre nézve - 1:1 hasadási arányt mutattak.

A molekuláris vizsgálatokban öt RAPD markert azonosítottunk, melyek kapcsolatot mutatnak a rezisztencia génnel. A gén és a markerek kromoszómális pozíciójának meghatározásához az általunk fejlesztett - a burgonya genetikai kutatásokban ezidáig nem alkalmazott - intron-targeting markereket, valamint – más kutatócsoportok eredményeit figyelembe véve – a burgonya XII. és XI. kromoszómájára térképezett markereket használtuk. Az intron-targeting vizsgálatok során azonosítottunk egy a Ry_{sto} génnel kapcsolt markert (*Cat-in2*), amelyet a XII. kromoszómán lokalizáltunk. Ezen felül a korábban a XII. kapcsoltsági csoportba térképezett *STM0003* valamint *STM2028* SSR markerek primerjei által felszaporított, a várttól eltérő méretű markerek mutattak még kapcsoltságot egymással és a génnel. Ugyanakkor a - korábban a burgonya XII. kromoszómájára térképezett - *GP122₅₆₄* CAPS marker és a Ry_{sto} gén között is tudtunk kapcsoltságot kimutatni. A munkánk során létrehoztunk tehát egy új – RAPD, SSR, CAPS és intron-targeting módszerrel azonosított markereket tartalmazó - genetikai térképet a burgonya genom Ry_{sto} gént tartalmazó régiójáról. A markerek összesen 37,9 cM genetikai távolságot fednek le.

A génhez közelebb térképezett négy RAPD markerből egyet SCAR markerré (*SCAR $y_{sto}4$*) konvertáltunk, melyet az *STM0003-III* markerrel együtt sikeresen alkalmaztunk szelekcióra egy gyakorlati nemesítési programban.

ABSTRACT

The aims of this research project were to determine markers linked to the PVY (*Potato Y potyvirus*) extreme resistance gene *Ry_{sto}* originating from *Solanum stoloniferum*, mapping of the gene containing region, and to develop a selection system based on PCR-markers.

The infection tests and molecular examinations were performed on a segregating population consisting of 195 tetraploid F₁ genotypes. In this research project the map of the chromosome region containing the *Ry_{sto}* gene was constructed from five RAPD, one intron-targeting, two SSR markers, and a CAPS marker. One of the RAPD markers was converted to SCAR type marker.

This SCAR marker and one of the SSR markers were applied successfully to selection in a practical resistance breeding program.

INHALTSANGABE

Die Ziele dieses Forschungsprogramms waren: das Markieren und das Setzen des *Ry_{sto}* Gens an der Genom-Karte, das von *Solanum stoloniferum* herkommt. Dieses Gen ergibt extreme Resistanz dem PVY (*Potato Y potyvirus*) gegenüber. Außerdem haben wir ein Markergestütztes Selektionssystem (MAS) auch ausgeführt. Die ansteckenden und molekularischen Analysen haben wir an 195 tetraploide F₁ Genotypen ausgemacht. Endlich haben wir eine Genom-Karte von der Region des *Ry_{sto}* Gens hergestellt. Unsere Karte enthält fünf RAPD, ein intron-targeting, zwei SSR Markers und ein CAPS marker. Ein RAPD Marker haben wir für SCAR Marker umgesetzt. Der SCAR und ein SSR Marker haben wir in der praktischen Resistanz-Veredelung erfolgreich verwandt.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

adg:	<i>Solanum tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>
AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
BAC:	Bacterial Artificial Chromosome
BC:	Backcross
BSA:	Bulk Segregant Analysis
CAPS:	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cDNS:	Complementary DNA
chc:	<i>Solanum chacoense</i>
cM:	Centimorgan
DAS-ELISA:	Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
dem:	<i>Solanum demissum</i>
DH:	Double haploid
EDTA:	Ethylene-diamine tetra-acetic acid
ER:	Extreme resistance
EST:	Expressed Sequence Tag
FISH:	Fluorescent in situ hybridization
HR:	Hypersensitive reaction
IRAP:	Inter- Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR:	Inter Simple Sequence Repeats
LRR:	Leucine-reach repeat
MS:	Murashige and Skoog
NBS:	Nucleotide Binding Site
NIL:	Near Isogenic Line
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PLRV:	Potato Leafroll luteovirus
PVA:	Potato A potyvirus
PVX:	Potato X potexvirus
PVY:	Potato Y potyvirus
QTL:	Quantitative Trait Loci
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA
REMAP:	Retrotransposon-Microsatellite Amplified

	Polymorphism
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGL:	Resistance Gene like
RIL:	Recombinant Inbreed Line
SCAR:	Sequence-Characterized Amplified Region
SNP:	Single Nucleotid Polymorphism
SSR:	Simple Sequence Repeat
sto:	<i>Solanum stoloniferum</i>
STS:	Sequence Tagged Site
TBE:	Tris/Borate/EDTA
tbr:	<i>Solanum tuberosum</i>
TE:	Tris- EDTA
TMV:	Tobacco mosaic tobamovirus
WL:	White Lady

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	12
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	16
2.1. A burgonya rendszertana és jelentősége.....	16
2.2. A burgonya genetikája.....	17
2.3. Morfológiai és molekuláris genetikai markerek.....	19
2.4. Térképezési populációk.....	19
2.5. DNS-alapú markerezési módszerek.....	20
2.5.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	20
2.5.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	20
2.5.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	21
2.5.4. SSR (Simple Sequence Repeat).....	22
2.5.5. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).....	22
2.5.6. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences).....	23
2.5.7. SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region).....	23
2.5.8. Intron-targeting módszer.....	24
2.6. Kapcsoltsági térképek.....	24
2.6.1. Kapcsoltsági térképek és molekuláris markerek a burgonyában.....	25
2.7. Burgonya Y vírus (PVY).....	26
2.8. A burgonya vírus rezisztenciája.....	27
2.8.1. A PVY rezisztencia.....	29
2.8.1.1. PVY hiperszenzitív rezisztencia gének a burgonyában.....	29
2.8.1.2. PVY extrém rezisztencia genetikája.....	29
2.8.1.2.1. Solanum stoloniferum eredetű PVY extrém rezisztencia gén (Rysto).....	30
2.9. Marker alapú szelekció (MAS).....	32
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	34
3.1. Növényanyag.....	34
3.1.1. Pedigré információk.....	34
3.1.2. Hasadó populáció előállítása.....	35
3.1.3. A markerek alkalmazhatóságának vizsgálatához felhasznált fajták.....	35
3.1.4. Solanum stoloniferum származékok.....	36
3.1.5. A markerek használhatóságának ellenőrzéséhez felhasznált populációk.....	36
3.1.5. A markerek alkalmazhatóságának ellenőrzéséhez felhasznált populációk.....	36
3.1.6. A növények in vitro fenntartása.....	36
3.2. PVY rezisztencia vizsgálata.....	37
3.2.1. Fertőzés.....	37
3.2.2. DAS-ELISA teszt.....	37
3.3. Molekuláris analízis.....	38
3.3.1. DNS tisztítás.....	38
3.3.2. Bulkok képzése és RAPD analízis.....	38
3.3.3. Elektroforézis, gél értékelés.....	39
3.3.4. Intron-targeting analízis.....	39
3.3.4.1. Primer tervezés.....	39
3.3.4.2. PCR reakció és gélelektroforézis.....	39
3.3.5. Funkcionális markerek vizsgálata.....	40
3.3.6. Mikroszatellit analízis.....	40
3.3.7. Rysto génhez kapcsolt egyéb markerek alkalmazhatósága.....	40
3.3.7.1. AFLP markerek vizsgálata.....	40
3.3.7.2. STS és CAPS markerek vizsgálata.....	41

3.3.4.1. A Ryadg specifikus SCAR marker vizsgálata a Rysto gént hordozó genotípusok szelekciójában.....	42
3.3.6. Kapcsoltsági analízis.....	42
3.3.7. RAPD marker szekvenálása és specifikus primerek tervezése.....	42
3.3.8. Homológia vizsgálat.....	43
4. EREDMÉNYEK.....	43
4.1. A fertőzési tesztek eredményei.....	43
4.2. Molekuláris vizsgálatok eredményei.....	44
4.2.1. Markerezés és térképezés eredményei.....	44
4.2.1.1. Bulk analízis, RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) analízis.....	44
4.2.1.2.1. Intron-targeting vizsgálatok eredményei.....	47
4.2.1.2.2. Az SSR és funkcionális markerek vizsgálatainak eredményei.....	50
4.2.2. A markerek fragmentumok eredete.....	52
4.2.3. RAPD markerek szekvenálása.....	52
4.2.4. Homológia vizsgálat	53
4.2.5. Markerekre alapozott szelekciós rendszer	54
4.2.5.1. SCAR markerek tervezése.....	54
4.2.5.2. A markerek tesztelése különböző PVY rezisztenciájú fajtákon	55
4.2.5.3. A markerek szelekciós alkalmazhatóságának vizsgálata a gyakorlati nemesítésben.....	56
4.2.5.4. Publikált Rysto markerek vizsgálata.....	59
4.2.5.4.1. AFLP vizsgálatok.....	59
4.2.5.4.2. STS és CAPS markerek vizsgálata.....	60
4.2.5.5. A Ryadg specifikus SCAR marker vizsgálatának eredményei.....	63
5 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	64
5.1. A Rysto gén markerezése valamint lokalizálása a tetraploid burgonya genomban.....	64
5.2. A markerek szelekciós alkalmazhatóságának vizsgálata.....	69
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	72
7. REFERENCIÁK.....	74
8. TÉZIS PONTOK.....	88
8.1. Tézispontok magyarul.....	88
8.2. Thesis statement.....	90
9. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK ELŐADÁSOK....	92
9. FÜGGELÉK.....	95
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	107

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A mai növénynemesítési munka egyik legfontosabb feladata, az abiotikus és biotikus stresszekkel szemben ellenálló fajták előállításának a kiváló beltartalmi értékekre és egyre nagyobb produktivitásra történő nemesítési célok megvalósítása mellett. A környezetterméscsökkentő hatásaira kevésbé érzékeny fajták termesztésbe vonása és minél szélesebb körű alkalmazása csökkentheti a termelés kockázatát. Ezáltal a növény mind a számára kedvezőtlen időjárású években, mind pedig a kórokozóval fertőzött területeken nagyobb biztonsággal termesztethető, hiszen ellenálló képességénél fogva ezekre a negatív hatásokra a termés minőségének és mennyiségének érdemi csökkenése nélkül reagál.

Az utóbbi években, a hazai burgonyatermesztésben mutatkozó tendencia szerint, a burgonya vetésterülete folyamatosan csökken (KSH, 2006). Az egyre kisebb termőterületen a szükséges termésmennyiség csak növekvő termésátlaggal érhető el, amely a termelők részéről a megfelelő agrotechnika alkalmazásán kívül, egy fajtahasználati szemléletváltást is szükségessé tesz. Jelenleg a köztermesztésben nagy hányadban fogékony külföldi - főleg holland - fajtákat termesztünk, míg a hazai viszonyok között nemesített rezisztens fajták aránya csak 18%.

A hazai termésátlagok az EU termésátlagainak még az 50%-át sem érik el, amelynek oka a gyenge minőségű, leromlásra hajlamos, vírusfogékony vetőgumó használata (Wolf 2006). Magyarországon a burgonya termesztés szempontjából a vírusok jelentik a legnagyobb kockázatot, hiszen komoly szerepet játszanak a leromlásban és a terméskiesésben. Hazánkban a burgonyát fertőző mintegy 30 vírus közül a járványos megbetegedéseket okozó burgonya Y (PVY), és burgonya levélsodródás vírusok (PLRV) a legjelentősebbek. A PVY az 1950-es évektől kezdve egyre gyakrabban fordul elő, és mára már minden évben járványt okoz a fogékony fajtákban. Ebben a jelenségben szerepet játszanak egyrészt a magyarországi - a vírusterjedés szempontjából kedvező - ökológiai feltételek és a fajtahasználati „kultúra”, azonban a legnagyobb szerepe a vírus terjedését segítő levéltetveknek van (Wolf 2001). A vírusfertőzés minőségre és mennyiségre gyakorolt negatív hatását több hazai felmérés is egyértelműen kimutatta (Wolf et al. 1996, Horváth és Wolf 1999, Wolf és Horváth 2000). A fertőzöttség függvényében a termésmennyiség akár 80%-kal is csökkenhet. A vírusok gyorsan terjednek a növényben; kemikáliákkal nem, vagy csak nehezen védekezhetünk ellenük. Ugyanakkor a kórokozó legyengíti, így sok más betegséggel, valamint a különböző abiotikus stresszekkel - mint a hazánkban a tenyészidőszakban gyakran előforduló szárazsággal - szemben is fogékonyabbá teheti a növényt. Mindezen okok miatt a vírusok elleni védekezés

és az általuk okozott kár mérséklésének lehetőségét régóta vizsgálják (Wolf 2001). A megoldást a preventív védekezési formák, vagyis a növény és a kórokozó közötti kapcsolat kialakulásának gátlása jelentheti. Így nagy jelentősége van a vírusokat terjesztő vektorok elleni védekezésnek, amely történhet növényvédő szerekkel, megfelelő agrotechnikai eszközökkel - mint például a deszikkálás - vagy vírusmentes szaporító anyag alkalmazásával. Ezek mellett a leghatékonyabban alkalmazható eszközt, a komplex rezisztenciát hordozó fajták előállítását és használatát jelentheti.

A manapság termesztett fajták nagyobb része hazánkban utántermesztésre alkalmatlan, vírusfogékonyságuk és az ebből következő csökkenő termőképességük miatt. Ezért a megfelelő minőségű termés előállítása csak a vetőgumó évről-évre történő megvásárlásával lehetséges. Ez természetesen megnövekedett termelési költségeket eredményez, ami csak magasabb piaci árral kompenzálható.

A Keszthelyen közel ötven éve folyó céltudatos rezisztencia nemesítési munka eredményeként mára számos, kiváló beltartalmi értékkel, megfelelő produktivitással, és több patogénnel szemben magas szintű ellenállósággal rendelkező fajtát állítottak elő, amelyekből kettő már az EU fajtalistájára is felkerült. A keszthelyi nemesítésű fajták rezisztensek a burgonyavész és a fonálféreg egyes, hazánkban is előforduló rasszaival, valamint a legjelentősebb gazdasági károkat okozó vírusokkal (PLRV, PVX, PVY) szemben is, ezért akár több évig is utántermeszthetők - így megfelelő eszközei lehetnének a fajtaváltásnak. A külföldi fajtákat meghaladó termésstabilitásuk - a termesztési arányuk növelésével - alkalmassá teszi őket a költséghatékonyabb, ezáltal versenyképesebb termesztésre. A burgonyában meglévő termés potenciál hatékonyabb kiaknázásának - a szükséges termesztési technológia betartása mellett - a keszthelyi nemesítésű fajták a megfelelő eszközei lehetnek, így az országos szükséglet a nagyobb termésátlagokkal a folyamatosan csökkenő termőterületen is előállítható.

Mivel ezek a fajták a burgonyatermesztésben legnagyobb károkat okozó patogénnel szemben rezisztensek, nincs szükség kémiai védekezésre, amely a környezet megóvásának, valamint a termesztés költségeinek csökkentése szempontjából nagy jelentőséggel bír. A komplex rezisztenciával bíró fajták lehetővé teszik a természettel jobban harmonizáló termesztési formák, így a 'bio' vagy 'low input' termesztés elterjedését, és az egészségesebb élelem előállítását. Ezek a technológiák, a túltermeléssel küzdő és jobb életminőségre áldozni hajlandó fejlett országokban különösen jelentősek, míg az állandó forráshiánnyal szembe néző kevésbé fejlett gazdaságokban, az alacsony befektetési igény miatt fontosak.

A multiplex rezisztencia kialakítása során a nemesítők több vad *Solanum* fajt használtak forrásként. A fajták így ugyanazon kórokozó ellen ható, több fajból származó rezisztenciagént is tartalmaznak piramidált formában, amelyek még az - időközben megjelenő - új törzsekkel szemben is ellenállóvá tehetik őket. A keszthelyi nemesítésű fajtákat, így – a világon először Magyarországon azonosított - a korábban ismert rezisztenciaformákat áttörő PVY^{NTN} törzssel (Beczner et al. 1984) sem lehet megfertőzni.

A vad fajok nemesítés szempontjából kívánatos tulajdonságainak introgressziója a termesztett burgonya hosszsadalmas folyamat. A keresztezések során a rezisztenciagénekkel együtt a donor genomba került számos nemkívánatos tulajdonság kiküszöböléséhez, éveken át tartó visszakeresztesés szükséges, folyamatos szelekció mellett. A kívánt tulajdonságok nyomon követését azonban, az azokhoz szorosan kapcsolt molekuláris markerek segíthetik. A marker alapú szelekció gyakorlati alkalmazásával a fajták előállítási ideje, - a szelekciós rendszer markerekkel megnövelt áteresztőképességének, és pontosságának következtében - lerövidíthető, ezáltal költségtakarékosabbá tehető. Egy adott tulajdonságot meghatározó génnel (például vírus rezisztenciagénhez) szorosan kapcsolt markerek szükségtelessé teszik a növények felnevelését, és a több ismétlésben elvégzett így idő és munkaigényes rezisztencia teszteket. Egy keresztezés során a nemesítők akár több ezer egyedet is előállítanak, amelyekből az adott nemesítési program szempontjából legjobb tulajdonsággal rendelkező egyedek kerülnek kiválogatásra. A marker alapú szelekció ugyanakkor lehetővé teszi az egyszerre több tulajdonságra történő szelektálást, mellyel még rövidebbé és költséghatékonyabbá válik a fajta előállítás.

Emellett a növény-kórokozó kapcsolat, valamint a különböző védekezési mechanizmusok genetikai hátterének megértésében is nagy szerepe van a molekuláris technikák alkalmazásának. A védekezési reakciókat szabályozó gének térképezésével, pozíciójuk meghatározásával lehetővé válik azok izolálása és nemesítési hasznosítása. Ma már számos tudományos eredmény áll rendelkezésre - a termesztésben fontos szerepet játszó növényfajok mindegyike, így a burgonya esetében is - a növény és az azt károsító legfontosabb patogének kapcsolatáról, a védekezési mechanizmusokról. Ezek a kutatási eredmények hatékonyabbá teszik a nemesítők és termesztők kórokozókkal szembeni küzdelmét.

A Keszthelyen nemesített burgonya fajták komplex rezisztenciával rendelkeznek, számos burgonya patogénnel, így a burgonya Y vírussal (*Potato Y potyvirus* PVY) szemben is. Ezen fajták nemesítése során számos vad *Solanum* faj mellett, a *Solanum stoloniferum*-ot használták a PVY extrém rezisztencia kialakításához. Az értekezésben ismertetett kutatási

program legfontosabb célja a keszthelyi nemesítésű fajtákra jellemző *S. stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus extrém rezisztenciagénhez (Ry_{sto}) szorosan kapcsolt PCR alapú markerek detektálása, valamint ezen markerekre alapozott szelekciós rendszer kifejlesztése volt. Továbbá célul tűztük ki a gén körüli kromoszóma régió térképezését, illetve a markerek és a gén kromoszómális helyzetének meghatározását. A gén mindkét oldalán elhelyezkedő szorosan kapcsolt markerek lehetőséget nyújthatnak a gén későbbi térkép alapú izolálásához. A kutatási program tudományos eredményeit a Keszthelyen folyó rezisztencia nemesítési programokban tervezzük hasznosítani.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A burgonya rendszertana és jelentősége

A burgonya, a 2005. évi termésátlagok alapján – 321 millió tonna össztermésével – az ötödik legfontosabb élelmiszernövény a világon (<http://faostat.fao.org>). Fontosságát élelmezési szempontból, az elérhető nagy termésmennyiségen kívül, nagy kalória és szénhidrát tartalma adja. Ezenkívül számos más fontos tápanyagot nyújt, mindamellett kiváló C-vitamin forrás (Niederhauser 1993, Bamberg és del Rio 2005), egyúttal fontos ipari alapanyag is.

A termesztett burgonya (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) a *Solanum* nemzetség diverz, több mint 3000 növényfajt magába foglaló *Solanaceae* családjába tartozik. Ez a növénycsalád a burgonyán kívül számos más – élelmezési és növénytermesztési szempontból szintén jelentős – növényt is tartalmaz, mint a paprika (*Capsicum annuum* L.) paradicsom (*Solanum lycopersicon* L.), dohány (*Nicotiana tabacum* L.) és a tojásgyümölcs (*Solanum melongena* L.).

A burgonya géncentruma Dél-Amerika perui, bolíviai vidékei, valamint Közép-Amerika mexikói része, ahol a vad fajok nagy alakgazdagságban fordulnak elő (Stelzner és Lehmann 1940, Mándy 1965). A vad burgonya fajok között 235 gumóképző és nem képző fajt írtak le, melyek közül mindössze hét a termesztett (Hawkes 1990, Chen 2000). A génusz legdominánsabb képviselője ezek közül a termesztett *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*.

A faj valószínűsíthetően a *S. tuberosum* ssp. *andigena* vad fajból alakult ki az évszázadokon át történő nemesítés és termesztés során. A termesztett burgonya kialakulásában azonban más vad fajok is szerepet játszottak. A fejlődési folyamatok során először a *S. leptophyes* (2x) fajból kialakult a *S. stenotomum* (2x), amelyből – a *S. sparsipilum* (2x) vad fajjal hibridizálva, és a kromoszómaszám természetes megduplázódásán keresztül – jött létre a *S. tuberosum* ssp. *andigena* (4x). Ez utóbbiból alakult ki később a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (4x) (Hawkes 1990, Mackay 2005).

Habár a burgonya Európába kerülésével kapcsolatban nincsenek pontos ismereteink, valószínűsíthető azonban, hogy a 16. században Spanyolországon és Olaszországon, esetleg Anglián keresztül került Európába. Általános elterjedéséhez azonban több évszázadra volt szükség (Mándy 1965). Ebben, az akkori idők sorozatos rossz gabona termésének, valamint az ennek hatására fellépő éhínségeknek volt nagy szerepe. Magyarországra valószínűleg a 17. század közepén került, elterjedése és a termesztés felkarolása azonban csak a 18. század végére tehető, amelyben a Keszthelyen tevékenykedő Pethe Ferencnek volt nagy szerepe.

Hazánk klímája ugyan nem a legalkalmasabb a burgonya termesztésére, mégis az ország több régiójában alakult ki termesztő körzete. Magyarországon 2005-ben, megközelítőleg 25 ezer ha-on termesztették, 24,5 t/ha termésátlaggal, így mintegy 607 ezer tonna termett (<http://faostat.fao.org>).

2.2. A burgonya genetikája

A burgonya haploid kromoszómaszáma akárcsak a legtöbb *Solanaceae* nemzetségbe tartozó fajnak $x = 12$, az egyes burgonya fajok ploiditása azonban a diploidtól egészen a hexaploidig változhat. A termesztett burgonya négy homológ genom komponenssel rendelkező ($2n = 4x = 48$) autotetraploid faj (Hawkes 1994), ezért öröklődése sokkal komplexebb, mint a diploid szervezeteké (Wricke és Weber 1986, Haynes és Lu 2005). Míg a diploid fajokban egy adott lókuszt domináns (A) vagy recesszív (a) alléljei 'AA', 'Aa', és 'aa' kombinációkban fordulhatnak elő, addig a tetraploid burgonyában a lehetséges variációk 'AAAA' (quadriplex), 'AAAa' (triplex), 'AAaa' (duplex), 'Aaaa' (szimplex), és 'aaaa' (nulliplex) lehet (Watanabe et al. 2005). Az ezek keresztezésekor kialakuló lehetséges hasadási arányokat a 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A várt genotípusos és fenotípusos hasadási arányok, egy adott allélt különböző dózisban tartalmazó tetraploid egyedek keresztezése esetén. (Song 2004. nyomán)

Kombináció	Genotípus	Fenotípus
	AAAA : AAAa : AAaa : Aaaa : aaaa	A : a
AAAA x AAAA	36 : 0 : 0 : 0 : 0	36 : 0
AAAA x AAAa	18 : 18 : 0 : 0 : 0	36 : 0
AAAA x AAaa	6 : 24 : 6 : 0 : 0	36 : 0
AAAA x Aaaa	0 : 18 : 18 : 0 : 0	36 : 0
AAAA x aaaa	0 : 0 : 36 : 0 : 0	36 : 0
AAAa x AAAA	9 : 18 : 9 : 0 : 0	36 : 0
AAAa x AAAa	3 : 15 : 15 : 3 : 0	36 : 0
AAAa x AAaa	0 : 9 : 18 : 9 : 0	36 : 0
AAAa x aaaa	0 : 0 : 18 : 18 : 0	36 : 0
AAaa x AAAA	1 : 8 : 18 : 8 : 1	35 : 1
AAaa x AAAa	0 : 3 : 15 : 15 : 3	11 : 1
AAaa x AAaa	0 : 0 : 6 : 24 : 6	5 : 1
Aaaa x AAAA	0 : 0 : 9 : 18 : 9	3 : 1
Aaaa x AAAa	0 : 0 : 0 : 18 : 18	1 : 1
Aaaa x AAaa	0 : 0 : 0 : 0 : 36	0 : 36

'A'=domináns allél, 'a'=recesszív allél

A keresztezések során azonban nem mindig a táblázatban megjelölt hasadási arányokat kapjuk, amelynek különböző okai lehetnek. Az autotetraploidok négy kromoszóma készlete homológ, így a meiotikus párosodás a homológ kromoszómák között teljesen véletlenszerű. Ezzel szemben Bradshaw (1994) szerint a *S. tuberosum* inkább szegmentális allotetraploid ami a kromoszómák nem random párosodásából valamint a dupla redukcióból adódhat. Ugyanakkor a megfigyelt hasadási arányokat a vizsgált gén és a centromer közötti távolság is befolyásolhatja. Amennyiben a gén proximálisan helyezkedik el a centromertől akkor a megfigyelt hasadási arányok a vártnál (a táblázatban megjelölt hasadási arányok) közelítenek, míg a gén disztális elhelyezkedése esetén a várt hasadási arányoktól eltérő eredményt kaphatunk.

A burgonya haploid genomja megközelítőleg 800-900 millió bázispár nagyságú, amelyben a gének számát 25000-55000 közöttire becsülték (Arumuganathan és Earle 1991). Később cDNS elemzési programok rávilágítottak, hogy ezekből körülbelül 35000 a paradicsoméhoz hasonló (van der Hoeven et al. 2002.) Az utóbbi néhány évtizedben felgyorsult genom elemzési programok további bizonyítékokat is feltártak a *Solanaceae* nemzetségbe tartozó fajok genetikai hasonlóságára vonatkozóan. A burgonya - paradicsom összehasonlítás során kiderült, hogy kilenc kromoszómán a lókuszok sorrendje azonos (Bonierbale et al. 1988; Tanksley et al. 1992). A két faj genomjának hasonló G+C tartalma és a markerek reciprok hibridizációja is megerősíti, hogy a genomjaik nagyrészt konzervált szekvenciákat tartalmaznak (Messeguer et al. 1991). Ezt később EST (Expressed Sequence Tag) szekvenciák összehasonlító vizsgálatával is alátámasztották (Ronning et al. 2003). Doganlar és munkatársai (2002) megállapították, hogy a *Solanaceae* fajok domesztikációja során csak kis számú mutáció hatott a fő fenotípusos bélyegeket meghatározó lókuszokra. A nagyobb méretű kapcsoltsági boxok kolinearitásából pedig arra következtettek, hogy a *Solanaceae* fajok egy közös őstől származnak.

A burgonya-*Arabidopsis* összehasonlító vizsgálatok pedig arra engednek következtetni, hogy a növényi genomokban a korábban feltételezetteknel magasabb fokú strukturális konzerváció van (Gebhardt et al. 2003).

A rezisztencia gének (*R*) összehasonlítása során megállapították, hogy azok ugyan eltérő kórokozó-specifitással, de hasonló pozícióban helyezkednek el. Ennek magyarázata, hogy míg a gének specifikitása gyorsan fejlődhet, alléjaik általános funkciója azonban konzervált a rokon növényfajok homológ lókuszaiban (Grube et al. 2000). Ezek az ismeretek lehetővé teszik, hogy a paradicsomban kapott térképezési eredmények kiindulási alapot nyújtsanak a burgonya térképek elkészítéséhez (Watanabe 1994).

A hasonlóságok ellenére számos, az evolúció során kialakult genom átrendeződést is feltérképeztek. A burgonya – paradicsom összehasonlításban ezt Bonierbale és munkatársai (1988), míg a burgonya, paradicsom, paprika vonatkozásában Livingstone és munkatársai (1999) vizsgálták.

2.3. Morfológiai és molekuláris genetikai markerek

A genetikai markereket a növénynemesítők régóta használják a nemesítés szempontjából értékes tulajdonságok nyomon követésére, és a genetikai variációk kimutatására. Használatukkal az egyedek vagy fajok között genetikai különbségek – polimorfizmusok – mutathatók ki. A markerek lehetnek konvencionális morfológiai vagy molekuláris markerek. Az elsőként használt morfológiai markerek, mint a virág vagy a mag színe könnyen azonosíthatóak, azonban hátrányuk, hogy számuk limitált, és megjelenésüket a környezeti hatások mellett a különböző gének kölcsönhatások is nagymértékben befolyásolhatják. Ugyanezek a módosító hatások befolyásolják a molekuláris markerek közül a fehérje markereket is, melyeket elsőként használtak (alloenzimek, izoenzimek) a polimorfizmusok azonosítására. A molekuláris technikák fejlődésének köszönhetően azonban lehetővé vált a DNS markerek használata. Ezek előnye, hogy az előzőekkel szemben nincsenek kitéve a fent említett módosító hatásoknak, valamint az azonosítható markerek száma, és az általuk mutatott variabilitás lényegesen nagyobb.

2.4. Térképezési populációk

Adott tulajdonságot meghatározó gén(ek) térképezésének, markerezésének valamint kapcsoltsági térképek szerkesztésének alapja egy, a vizsgálat céljának megfelelő, hasadó populáció előállítása. Adott tulajdonságot meghatározó gén markerezéshez azon szülőkombinációk az ideálisak, melyek csak a markerezendő tulajdonságban különböznek egymástól. Ez a gyakorlatban azonban hosszadalmas nemesítési előkészítő munkát igényel (például NIL - Near Isogenic Lines előállítása).

Adott gén térképezéshez és kapcsoltsági térképek szerkesztéséhez, a keresztezés során olyan szülőpartnereket kell kiválasztani, amelyek megfelelő genetikai távolságra vannak egymástól a lehető legtöbb polimorfizmus detektálása érdekében. A térképező populációk igen különbözőek lehetnek. Leggyakrabban F_2 , BC (Backcross), RIL (Recombinant Inbred Lines), és DH (Double Haploid) populációkat használnak. Néhány magasabb ploidfokú, vagy beltenyésztést nem tűrő növényfaj esetében, például a tetraploid burgonyában, a hasadó F_1 utódnemzedék is alkalmazható térképezésre. Erre azért van szükség, mert a faj - főleg diploid

szinten megnyilvánuló - öninkompatibilitása, valamint beltenyésztési depressziója miatt speciális genetikai alapanyagok (például beltenyésztett vonalak) előállítására kevésbé alkalmas (Gebhardt 1989, 1991; Chen 2000). A szülői allélok konfigurációját minden lókuszra meghatározva a rekombinációs események azonosíthatók, és a kapcsoltság kiszámítható (Ritter et al. 1990). A markerekből - egymáshoz viszonyított sorrendjük megállapítását követően - kapcsoltsági csoportok szerkeszthetőek, melyek nagy számú marker esetén a kromoszómákat reprezentálhatják.

2.5. DNS-alapú markerezési módszerek

2.5.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A restrikciós endonukleázok felfedezése nyitott utat az első DNS markerek kifejlesztéséhez. A genomok jellemzésére elsőként használt molekuláris markerezési technika az RFLP volt (Grodzicker et al. 1974). A módszer alapja, hogy a különböző genomok eltérő pozíciókban tartalmaznak restrikciós emésztési helyeket, mely különbségek a következő módon mutathatók ki: A genomot restrikciós endonukleázokkal emésztve, a kapott fragmentumokat gélelektroforézisben szétválasztjuk, majd jelölt próbák felhasználásával Southern-hibridizációt (Southern 1975) végezve a genomok megkülönböztethetőek. Az így detektált polimorf fragmentumok markerként használhatók (Botstein et al. 1980). A Southern-hibridizációhoz használt próbák lehetnek más rokon fajokból származó genomiális DNS darabok, szintetikus szekvenciák, vagy cDNS-ek. A módszer előnye, hogy a kapott marker kodomináns, vagyis a markerek alapján a heterozigóta és homozigóta egyedek megkülönböztethetőek, hátránya azonban, hogy kivitelezése bonyolult, időigényes, nagy mennyiségű DNS-t és a próbák izotópos, fluoreszcens vagy kemilumineszcens jelölését igényli.

Ezen technika alkalmazásáról - a burgonya vonatkozásában - először Barone és munkatársai (1990) számoltak be. Munkájuk során azonosítottak egy RFLP markert, amely kapcsoltságot mutat a *Globodera rostochiensis* ellen rezisztenciát biztosító *Gro1* génnel. Azóta egyéb, például a *Phytophthora infestans* ellen rezisztenciát biztosító *R1*, *R3*, *R6*, *R7* génekkel kapcsolt RFLP markereket is azonosítottak (De Jong et al. 1997; El-Kharbotly et al. 1994, 1996). Adott génnel kapcsoltan öröklődő markerek azonosítása mellett az RFLP technika alkalmazásának nagy szerepe van a kapcsoltsági térképek szerkesztésében is. A burgonya genetikai kutatások nagy részében referenciaként alkalmazott térképet (Gebhardt et al. 1991) is RFLP markerek felhasználásával készítették.

2.5.2. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

A polimeráz lánreakció (PCR-Polymerase Chain Reaction) kifejlesztését követően (Mullis et al. 1987) számos egyszerűbb, PCR-en alapuló markerezési technikát dolgoztak ki.

Az egyik legkönnyebben alkalmazható, és ezért nagyon elterjedt PCR-en alapuló markerezési technikát - a RAPD-t - Williams és munkatársai (1990) valamint velük egyidejűleg Welsh és McClelland (1990) fejlesztették ki. Ez a módszer véletlenszerűen kiválasztott primerek hibridizációján alapul, a genom indítoszekvenciával komplementer régióiban. Amennyiben a primerek 200-2000 bp-on belül megtalálják a komplementerüket egymással szemben lévő pozícióban, akkor egy, a primerek közötti távolságnak megfelelő DNS szakasz fog felszaporodni a PCR során. A módszer előnye, hogy egyszerű, gyorsan kivitelezhető, ugyanakkor hátránya, hogy az eredmények nem minden esetben reprodukálhatók. A módszerrel kapott markerek dominánsak, így a heteozigóta egyedek megkülönböztetésére nem alkalmasak.

Az RAPD analízis – egyéb markerezési technikákhoz hasonlóan - Bulk Segregant Analysis-el (BSA) (Michelmores et al. 1991) kombinálva jól használható monogénes tulajdonságokhoz kapcsolt DNS szakaszok azonosítására (Jacobs et al. 1996; Hosaka et al. 2001; Arnedo-Andrés et al. 2002; Bryan et al. 2002). A BSA során, adott tulajdonság alapján csoportokba rendezett egyedek DNS mintáit összekeverve, azok egyetlen - az osztályozás alapját szolgáló - tulajdonságban különböznek, így a PCR során detektált polimorf fragmentum - nagy valószínűséggel - az adott tulajdonsággal áll kapcsolatban.

A RAPD módszert gyorsasága és egyszerűsége ellenére ritkán alkalmazzák a burgonya genetikai kutatásokban. Elsőként Ballvora és munkatársai (1995) használták ezt módszert a *Globodera rostochiensis* ellen rezisztenciát biztosító *Gro1* génnel kapcsolt markerek azonosításához. Később Ronning és munkatársai (1999) detektáltak egy a leptin termelésért felelős QTL-hez kapcsolt RAPD markert.

2.5.3. AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

A polimeráz lánreakció, valamint a restrikciós enzimek kombinálásával fejlesztették ki az AFLP (Vos et al. 1995) technikát. A módszer alapja, hogy a genomiális DNS-t egy gyakran, és egy ritkán hasító restrikciós endonukleázzal emésztik, majd a fragmentumok ragadós végeihez kettős szálú DNS adaptereket ligálnak. A PCR reakció során az adapterekkel komplementer, de azoknál hosszabb, a fragmentum belseje felé nyúló primerekkel először pre-szelektív majd szelektív amplifikációt végeznek. A kapott fragmentumokat nagy felbontó képességű poliakrilamid gélen vagy fragmentanalizátorral választják szét. A polimorfizmus a

fragmentumok különböző hosszúságában nyilvánul meg. A módszer jó felbontó képességű, sok fragmentumot eredményez, a markerek dominánsak, a vizsgálatok kis mennyiségű DNS-t igényelnek, és az eredmények jól ismételhetők. Ugyanakkor hátránya, hogy bizonyos esetekben a primerek izotópos vagy kemilumineszcens jelölése szükséges, amely jelentős költségekkel jár. Mindemellett a módszer hátránya még, hogy a technikával azonosított markerek jelentős része gyakran csoportokban vagy egy helyre térképeződik (Livingston et al. 1999).

Az AFLP talán ez egyik leggyakrabban alkalmazott módszer a burgonya genetikai kutatásokban. Mára tucatnyi AFLP markert azonosítottak, amelyek kapcsolata a különböző - a nemesítés szempontjából jelentős - tulajdonságot meghatározó génekkel vagy QTL-ekkel (De Jong et al. 1997, Bendahmane et al. 1997, Rouppe van Der Voort et al. 2000). Ugyanakkor az AFLP markereket – hasonlóan az RFLP markerekhez – kapcsoltsági térképek szerkesztésére is gyakran alkalmazzák. Ennek egyik eredményeképpen jött létre a mintegy 10000 AFLP markert tartalmazó és folyamatosan bővülő UHD (ultra-high density) térkép is (<http://www.dpw.wau.nl/uhd/>).

2.5.4. SSR (Simple Sequence Repeat)

A növényi és állati genomok nagyszámú rövid, ismétlődő szekvenciát tartalmaznak (Hamada et al. 1982; Tautz és Renz 1984). Az ismétlődő egységek kettő, három, négy esetleg öt nukleotidból állnak, melyek egymás után, de genomként eltérő számban ismétlődnek. Ezeket a különböző hosszúságú fragmentumokat a konzervatív határszekvenciákra tervezett primerekkel felszaporítva a genomok között polimorfizmus detektálható, azaz a kapott fragmentum markerként használható (Jacobs et al. 1991). A kodominánsan öröklődő mikroszatellit markerek jól használhatóak kapcsoltsági térképek készítéséhez (Yu et al. 1994; Zhang et al. 1997), és a különböző térképezési munkákban referencia pontokként is alkalmazhatóak (Milbourne et al. 1998). A módszer hátránya, hogy a primerek tervezéséhez szükséges klónozás és szekvenálás miatt idő és költségigényes, valamint a különböző fragmentumok elválasztása és értékelése a sokszor csak egy-két bázispárnyi különbség miatt nehézkes.

Az SSR markereket Provan és munkatársai (1996) alkalmazták először különböző burgonya fajták azonosítására. Később ezen markerek felhasználásával, valamint új markerek fejlesztésével elkészítették a teljes diploid genomot lefedő kapcsoltsági térképet is (Milbourne et al. 1998). Mára különböző, például a *Globodera pallida* ellen rezisztenciát biztosító QTL –

ekhez (Bradshaw et al. 1998), vagy a *Pi* QTL-hez, amely a *Phytophthora infestans*-al szemben nyújt rezisztenciát azonosítottak kapcsolt SSR markereket (Milbourne et al. 1998).

2.5.5. ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

A Zietkiewicz és munkatársai (1994) által kifejlesztett technika, az SSR markerekhez hasonlóan, a genom ismétlődő szekvenciáinak felszaporításán, és az azokban rejlő polimorfizmusok kimutatásán alapul. Ebben a rendszerben a primereket úgy tervezik, hogy azok az ismétlődő motívumokat tartalmazzák, de egyik végükön extra nukleotidot is hordoznak. Így a primer kapcsolódása valamint az adott DNS szakasz amplifikációja csak akkor történik meg, ha az ismétlődő szakaszt határoló szekvenciák a primer 'extra nukleotidjaival' komplementerek. A marker általában a RAPD markerekhez hasonlóan domináns, de kodominánsként is viselkedhet.

A burgonya genetikai kutatásokban (Prevost és Wilkinson 1999) először burgonya fajták azonosításra, később különböző tulajdonságokat meghatározó gének markerezésére is használták ezeket a markereket. Marczewski és munkatársai (2002) például azonosítottak egy ISSR markert amely a burgonya S vírussal szemben rezisztenciát biztosító *Ns* génnel kapcsolt.

2.5.6. CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*)

A PCR amplifikáció során kapott DNS fragmentumokat restrikciós enzimekkel emésztve CAPS markereket (Konieczny and Ausubel 1993) kaphatunk, melyek az inszerciók, deléciók, és báziscserék következtében kialakult vagy elveszett restrikciós emésztési helyekben lévő különbségeket detektálják. Így egy monomorf mintázat esetén is detektálhatunk különbségeket. A módszer alkalmas arra, hogy a dominánsan öröklődő markerekből - szekvencia polimorfizmus esetén - kodomináns természetű markereket készítsünk.

Ezidáig a mintegy kilenc - általában valamilyen rezisztenciagénhez kapcsolt - CAPS markert azonosítottak a burgonya tekintetében (De Jong et al. 1997, Bendahmane et al. 1997, Kanyuka et al. 1999, Sorri et al. 1999, Rouppe van Der Voort et al. 1998, 1999a, 1999b, 2000), de a Chen és munkatársai (2001) által szerkesztett, a diploid burgonya genomot lefedő kapcsoltsági térkép is tartalmaz CAPS markereket.

2.5.7. SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*)

Az AFLP valamint RAPD vizsgálatok során kapott DNS fragmentumok klónozásával, majd szekvenálásával a kapott nukleotid sorrend alapján a markerre specifikus primerpárok tervezhetők, így a marker SCAR markerré alakítható (Paran és Michelmore 1993). A

módszerrel lehetőség nyílik az adott DNS fragmentum - mint marker - specifikus amplifikálására. Ez már kiválóan alkalmazható az adott tulajdonság – amelyhez a markert detektáltuk – szelekciójára. Az eljárással egy domináns marker akár kodominánssá is alakítható.

Kasai és munkatársai (1999) két SCAR markert fejlesztettek, melyeket sikeresen alkalmaztak a *S. t. ssp. andigena* vad burgonya fajból származó PVY extrém rezisztencia gént (Ry_{adg}) hordozó burgonya fajták és vonalak szelektálására.

2.5.8. Intron-targeting módszer

A módszer azon a megfigyelésen alapul, hogy a génekben lévő intronok kevésbé konzerváltak mint az exonok, tehát az intronokat határoló exon szekvenciákra primereket tervezve az intronokban rejlő különböző típusú polimorfizmusok (például hossz- vagy nukleotid polimorfizmus) kimutathatóak és markerekként használhatóak (Choi et al. 2004). A robbanásszerűen fejlődő molekuláris genetikai kutatások következtében elérhetővé vált óriási mennyiségű szekvencia információ szűrésével, elemzésével, az intronokat közrefogó exonokat a különböző szekvenciákban azonosíthatjuk. Egy adott intront határoló exon szekvenciákra primereket tervezve az intronokban rejlő különbségek kimutathatóak. A módszer előnye, hogy az exonok konzerváltságából következően minden allél amplifikációja lehetővé válik. Noha ez a technika kiválóan alkalmas adott tulajdonságokhoz kapcsolt markerek azonosítására valamint kapcsoltsági térképek szerkesztésére is, ezidáig a burgonya genetikai kutatásokban nem alkalmazták.

2.6. Kapcsoltsági térképek

A kapcsoltsági térképek szerkesztésének alapja a rekombinációs események azonosítása a genomban, fenotípusos vagy molekuláris markerekkel. A meiózis során a *crossing over*-ek, a genetikai anyagban elszórtan, eltérő gyakorisággal fordulnak elő. Ezek az események a térképező populáció egyedein markerek segítségével detektálhatók, így a markerek közötti távolság a rekombináció gyakoriságából kiszámítható. A távolság egysége a centimorgan (cM), amely 1%-os rekombinációs gyakoriságot jelent.

A genetikai távolság azonban relatív fogalom, hiszen míg 1cM az *Arabidopsis*-ban 200 kb, addig a burgonya nagyságrendekkel nagyobb genetikai állományában ez 1000 kb-t jelent. Ezenkívül a kromoszómákon többszörös *crossing over*-ek is előfordulhatnak, melyek torzíthatják a kapott genetikai távolságot. Ezeket térképfüggvények (Haldane 1919; Kosambi 1944) felhasználásával pontosíthatjuk. Ma már számos számítógépes program áll a tudomány

rendelkezésre, mint a Mapmaker (Lander *et al.* 1987; Lincoln *et al.* 1992), JoinMap (Van Ooijen és Voorrips 2001), TetraploidMap (Hackett és Luo 2003), amely megkönnyíti a függvények alkalmazását, és a kapcsoltsági térképek szerkesztését.

2.6.1. Kapcsoltsági térképek és molekuláris markerek a burgonyában

A más növényeknél használt konvencionális fenotípusos markerek a burgonyában nem állnak rendelkezésre (Watanabe 1997). A molekuláris genetika és összehasonlító genomika azonban olyan eszközöket nyújt a kutatás számára, amelyekkel a kívánt tulajdonságokat szelektálhatjuk, és az azokat meghatározó géneket vagy QTL-eket térképezhetjük. A genomok analizálásában a genetikai markereknek és a genetikai térképeknek felbecsülhetetlen szerepük van (Celebi-Toprak *et al.* 2005).

Az első, teljes burgonya genomot lefedő térképet Bonierbale és munkatársai (1988) készítették RFLP technikával, *S. phureja* x (*S. tuberosum* x *S. chacoense*) keresztezésből előállított diploid térképezési populációt használva. A kutatások nagy részében referenciaként alkalmazott kapcsoltsági térképet Gebhardt és munkatársai (1989) készítették diploid *S. tuberosum* populációt használva. A 12 kapcsoltsági csoportba lokalizált 141 RFLP markerből Dong és munkatársai (2000) 21 markert használtak BAC klóntárak azonosításához és jelölt próbák készítéséhez. A jelölt próbákkal FISH-t (Fluorescence In Situ Hybridization) végezve azonosították a burgonya mind a 12 kromoszómáját. A kromoszómákat a próbák származása alapján a kapcsoltsági csoportoknak megfelelően nevezték el. Tanksley és munkatársai (1992) visszakeresztetett *S. tuberosum* x *S. berthaulti* populációt használva készítettek RFLP és izoenzim markereket tartalmazó, az első térképnél nagyobb genetikai távolságot lefedő kapcsoltsági térképet. Az első SSR markereket tartalmazó térképet Milbourne és munkatársai (1998) készítették diploid térképező populációt használva. Chen és munkatársai (2001) a szénhidrát metabolizmusban és transzportban szerepet játszó - ismert funkciójú - gének különböző részeit funkcionális markerekként használva szerkesztettek egy, a teljes burgonya genomot lefedő kapcsoltsági térképet.

Ezek mellett, különböző térképezési populációkat használva egyéb, pl. transzpozonokat, AFLP, RAPD markereket (Jacobs *et al.* 1995, van Eck *et al.* 1995, Meyer *et al.* 1998, Perez *et al.* 1999) tartalmazó kapcsoltsági térképet szerkesztettek a burgonyában. Li és munkatársai (1998) használtak először tetraploid utódokat tartalmazó hasadó populációt a *Phytophthora infestans* ellen rezisztenciát adó *R2* allél térképezésére. Megállapították, hogy a térképezés illetve markerezés a tetraploid térképező populációkon a diploidokhoz hasonló

hatékonysággal végezhető, így elkerülhető a diploid populációk előállításához szükséges idő és költségigényes előkészítő munka.

Egy nagy telítettségű AFLP kapcsoltsági térkép készítése négy ország laboratóriumainak részvételével (Spanyolország, Franciaország, Skócia, Hollandia) nemzetközi együttműködés keretei között jelenleg is tart (<http://www.dpw.wau.nl/uhd/>). Ugyanakkor több ország részvételével (pl. Egyesült Királyság, USA, Kína, Hollandia, Németország) 2004-ben megkezdődött a burgonya teljes genomjának szekvenálása (<http://www.potatogenome.net/>).

2.7. Burgonya Y vírus (PVY)

A burgonya terméspotenciálja meghaladhatná a 400 millió tonnát, azonban az éves becsült termése a világon „mindössze” 290 millió tonna. Ez a jelenség különböző, a burgonyát fertőző betegségek termésredukáló hatásaival magyarázható (Agrios 1997). Mint klónosan szaporított növény a fertőzött vetőgumó továbbviszi a kórokozót a következő termelési szezonra, ezáltal fokozatos termés degenerációt okoz (Gebhardt és Valkonen 2001). A mérsékelt klímájú burgonyatermesztő területeken - így Magyarországon is - a legnagyobb problémát a vírusok, és a burgonyavész (*Phytophthora infestans*) által okozott terméscsökkenés jelenti.

A burgonyát károsító vírusok közül - az okozott kártételük és járványos előfordulásuk miatt - a burgonya Y vírus (PVY), valamint a burgonya levélsodródás vírus (PLRV) a legjelentősebbek (Horváth et al. 1995, Wolf et al. 1996).

A burgonya Y vírus, amelyet először a *S. tuberosum*-ban írtak le (Smith 1931), a számos fajt magában foglaló *Potyviridae* család *Potyvirus* nemzetségébe tartozik. A PVY a kártétele során - a vírustörzstől és a burgonya fajtától függően - akár 80%-os terméskiesést is okozhat (De Bokx és Huttinga 1981, Wolf 2001). A vírus mechanikailag, valamint levéltetvek közvetítésével nem perzisztens módon terjed (Brunt 2001), így a vektor egészséges növényre kerülve azonnal fertőzőképes lesz, nincs szükség lappangási időre. A védekezés a vírus kártétele ellen kemikáliákkal nehéz, általában a vektorok számának csökkentését jelenti. A lokális és szisztémikus tünetek alapján, a vírus következő törzseit különítették el:

- a mozaik tüneteket okozó, levelek elszáradásával majd lehullásával járó, leggyakrabban előforduló normál törzs a PVY⁰
- az enyhébb tünetekkel járó, de a dohányon érnekróvizist okozó PVY^N törzs
- valamint a PVY^C törzs, mely helper komponensek elvesztése miatt, nem képes a levéltetvekkel való terjedésre (Horváth 1966, 1967).

- 1984-ben megjelent egy, a korábbi törzseknél agresszívabb, az addig ismert rezisztenciákat áttörő vírustörzs a PVY^{NTN} (Beczner et al. 1984, Le Romancer és Kerlan 1992, van den Heuvel et al. 1994). Ez a törzs egyes burgonya fajtákon enyhe mozaik tüneteket okoz a gumó nektróza nélkül, míg más fajtákon a száron és a levélen nektrózt, esetleg nekrotikus gyűrűket, és a gumón is nekrotikus mintázatot idéz elő. Horváth és munkatársai (1991) a burgonya bogyóján okozott nekrotikus gyűrűs foltosságról is beszámoltak.

Később újabb variánsokat/csoportokat is azonosítottak, mint a PVY^{NW} (Chrzanowska 1987), PVY^Z (Jones 1990), amelyek érnektrózt okoznak a dohányban, azonban a PVY⁰ törzsre jellemző köpenyfehérje génnel rendelkeznek.

A vírus terjedésének biológiájából következően a legbiztosabb védekezési módot a fertőzés megelőzése és a rezisztencia kialakítása jelenti. Ezt vírusmentes szaporító anyagok előállításával és vírus rezisztens fajták használatával érhetjük el. A rezisztens fajták előállítása során a nemesítők a különböző vad *Solanum* fajokat, valamint ezek szaporulatait használják, mint rezisztenciaforrásokat a nemesítési programokban.

2.8. A burgonya vírus-rezisztenciája

A rezisztencia a növények azon képessége, amely során a betegségeket kontrollálni tudják (Thieme és Thieme 2005). A növényekben a vírushatás hatására jelentkező különböző típusú rezisztencia válaszok terminológiája nem egységes. Az intenzív kutatások eredményeként folyamatosan bővülő ismeretek, a különböző rezisztencia folyamatok közötti határok elmosódásához vezettek, amelyek definiálási problémákat vontak maguk után. Mára számos javaslat létezik a különböző rezisztencia szintek és típusok karakterizálására, kategorizálására (Cooper és Jones 1983, Ross 1986, Valkonen 1994, Solomon-Blackburn és Barker 2001).

A növények betegségekkel szembeni rezisztenciája alapvetően két fő kategóriára osztható, ezek a 'host' (gazda-parazita) és a 'non-host' (nem gazda-parazita) rezisztenciák (Fraser 1990). A burgonyában ismert - a vírushatás hatására kifejeződő - különböző szintű rezisztencia válaszok nagy része is az elsőként említett csoportba sorolható (Thieme és Thieme 2005). A burgonyában számos rezisztenciaforma ismert, mint például a fertőzéssel szembeni rezisztencia, vagy a vírus akkumulációjával illetve mozgásával szembeni rezisztencia. A legalaposabban tanulmányozott rezisztencia típusok, a nemesítés szempontjából előnyösebb aktív rezisztenciaformák. Ezek a védekezési reakciók két fő, monogénesen öröklődő specifikus rezisztenciatípusban, az ún. hiperszenzitív reakcióban (HR), valamint az extrém rezisztenciában (ER) manifesztálódhatnak.

A hiperszenzitív reakció az egyik legintenzívebben tanulmányozott védekezési forma. Felfedezése óta (Ward 1902) a folyamatot élettani, biokémiai vagy éppen genetikai szempontból leíró tanulmányok születtek. Ezek közül a munkák közül - habár nem tartozik szorosan a jelen dolgozat témájához - mindenképpen meg kell említeni Klement Zoltán professzor munkásságát, aki először írta le a baktériumok okozta hiperszenzitív reakció jelentőségét (Klement 1963).

Az *N* gének által kontrollált vírustörzs-specifikus (Cockerham 1970, Jones 1990) hiperszenzitív reakció során a növény, egy gyors sejtelhalással járó folyamat következményeként, lokális nekrotikus szimptomákat fejleszt, ezáltal a fertőzés helyén lokalizálja a kórokozót és meggátolja annak továbbterjedését (Russell 1978, Swiezynski 1994). A folyamat során a növény rezisztencia génjének terméke és a kórokozó bizonyos avirulencia génjének terméke közötti kölcsönhatás védekezési reakciót vált ki, amely jelátviteli láncon keresztül meggátolja a patogén szisztemizálódását (Flor 1971). A reakció eredményeképpen jönnek létre a néhány sejtre kiterjedő nekrotikus léziók. A HR megnyilvánulását nagymértékben befolyásolják olyan különböző környezeti tényezők, mint a hőmérséklet, ugyanakkor függ a növény egészségi állapotától, a géndózistól (Collmer et al. 2000) és a genetikai a háttértől is (Kang et al. 2005). Noha a rezisztencia alapvetően domináns jellegű, ismert néhány tanulmány amely a HR poligénikus öröklődéséről számol be (Solomon 1978; Davidson 1980).

Az aktív vírusrezisztencia másik ismert típusa, az *R* gének által szabályozott extrém rezisztencia (ER). A nemesítés szempontjából előnyösebb rezisztenciaválasz során, a fertőzés nagyon korai szakaszában - a sejtről sejtre történő vándorlás előtt fellépő - vírusszaporodás gátlása miatt a vírus koncentrációja alacsony szinten marad (Kang et al. 2005). Ennek következtében a fertőzött növények általában tünetmentesek, esetleg limitált nekrozisokat fejleszhetnek (Cockerham 1970). Az ER széles spektrumú rezisztenciát biztosít a különböző vírustörzsekkel szemben. Az *R* gének dominánsan öröklődnek, expressziójuk a fertőzött növényekben jelentkező extrém alacsony vírus koncentrációban nyilvánul meg (Thieme és Thieme 2005). Általában ez a rezisztencia típus nem jár együtt sejtelhalással (Hämäläinen et al. 1997, Gilbert et al. 1998), és - ellentétben a többi rezisztencia formával - protoplaszt szinten is megnyilvánul (Adams et al. 1986, Barker és Harison 1984, Kang et al. 2005). A PVY ellen extrém rezisztenciát biztosító *Ry* gének által szabályozott védekezési mechanizmus hasonló a tudomány számára legismertebb *Rx* gének által szabályozott PVX extrém rezisztenciához.

Noha az itt tárgyalt két rezisztencia típus több tulajdonságban különbözik egymástól, kutatási eredmények arra engednek következtetni, hogy az ER és a HR között kapcsolat áll fenn. Néhány szerző olyan - *R* gént hordozó - burgonya genotípusokról számolt be, amelyek limitált szisztemikus nekrozisokat fejlesztettek a vírussal való fertőzést követően (Ross 1958, Jones 1990; Valkonen et al. 1996; Hämäläinen et al. 1998; Vidal et al. 2002), annak ellenére, hogy az *R* gén domináns az *N* gén felett. Ebből arra következtettek, hogy az extrém rezisztencia a HR egy aktívabb expressziójának a következménye is lehet. Számos további tanulmányban is felvetődik, hogy a HR esetleg az ER része (Bendahmane et al. 1999, Mestre et al. 2000, Celebi-Toprak et al. 2002). Ross (1958) vizsgálatai során megfigyelte, hogy a fogékony genotípusok poligénjei eltolják az ER-t a HR felé a *Ry_{sto}* gént hordozó utódokban. Ezt támasztja alá Hämäläinen és munkatársainak (1997) megfigyelése is, miszerint a fogékony genotípusok génjei beavatkoznak az *Ry_{adg}* expressziójába, ezáltal a tünetmentes ER-t nekrotikussá változtathatják.

2.8.1. A PVY rezisztencia

2.8.1.1. PVY hiperszenzitív rezisztenciagének a burgonyában

Mára több – a PVY-al szemben hiperszenzitív reakciót szabályozó - *N* gént ismerünk, amelyeket a különböző vad *Solanum* fajokban és a *S. tuberosum*-ban írtak le. Ilyenek a *S. demissum*-ból származó *Ny_{dms}* (Cockerham 1970) és a *S. chacoense*-ből származó *Ny_{chc}* gének, amelyek a PVY mellett a PVA fertőzéssel szemben is hiperszenzitivitást biztosítanak a növénynek. Valkonen és munkatársai (1994) a *S. tuberosum* ssp. *andigena*-ban azonosítottak egy *N* gént (*Ny_{adg}*), amely a PVY normál törzsével szemben kontrollálja ezt a típusú védekezési reakciót. A *S. tuberosum*-ból származó *Ny_{ibr}* (Hutton 1951, Jones 1990) gént Celebi-Toprak és munkatársai (2002) a burgonya IV. kromoszómáján lokalizálták. Cockerham (1970) *S. stoloniferum*-ban is azonosított a PVY-al szemben hiperszenzitív-reakciót kontrolláló géneket (*Ry_{sto}ⁿ¹*, *Ry_{sto}ⁿ²*).

2.8.1.2. PVY extrém rezisztencia genetikája

Az *Ry* gének által szabályozott extrém rezisztencia a PVY minden törzsével szemben védettséget biztosít a növénynek. Ezt a típusú rezisztenciát Cockerham (1943) írta le először a *S. stoloniferum* vad fajban. Azóta egyéb, ER-t kontrolláló géneket azonosítottak különböző vad burgonya fajokban, melyeket széles körben használnak a rezisztencianemesítési programokban. A PVY-al szemben extrém rezisztenciát hordozó fajták előállításánál

leggyakrabban a *S. tuberosum ssp. andigena* a *S. chacoense* valamint *S. stoloniferum* vad burgonya fajokat használják.

A *S. tuberosum ssp. andigena*-ból származó monogénesen öröklődő domináns PVY extrém rezisztencia gént (Ry_{adg}) (Münoz et al. 1975), Hämäläinen és munkatársai (1997) - négy RFLP markerrel (*TG508*, *CD17*, *GPI25*, *CT168*) azonosított kapcsoltság alapján - a burgonya XI. kromoszóma hosszú karjának proximális végére térképezték. Ez a kromoszóma régió más *Solanaceae* fajok szinténikus régióiban, három másik rezisztencia gént is tartalmaz. Ilyen a dohányban lévő, a dohány mozaik vírussal (TMV) szemben rezisztenciát biztosító *N* gént tartalmazó régió is (Leister et al. 1996), amellyel három, a burgonyából származó RGL (Resistance Gene Like) fragmentum is magas szintű homológiát mutatott (Hämäläinen et al. 1998). Későbbi elemzések rávilágítottak, hogy az RGL fragmentumok 'predicted kináz2' és 'kináz3' motívumok; így ez volt az első olyan PCR alapú marker amely - mivel a markert egy rezisztencia gén-szerű fragmentumból fejlesztették - általánosan használható a rezisztencia tulajdonság szelekciójára. Kasai és munkatársai (2000) az RGL fragmentumok szekvencia különbségei alapján SCAR markereket fejlesztettek, amelyek alkalmazhatóságát eltérő genetikai háttérrel rendelkező fajtákon és nemesítési vonalakon tesztelték. Később Vidal és munkatársai (2002) klónozták és jellemezték a gént (*Y-1*), amelyen belül az egyik RGL fragmentum (*ADG2*) egy nukleotid kötő domént reprezentál. A génnel transzformált növények levelei azonban PVY fertőzés hatására nekrotikus léziókat fejlesztettek, és a növények szisztémikusan megfertőződtek a vírussal (Vidal et al. 2002).

Az Ry_{adg} génen kívül más - vad burgonya fajtából eredő - PVY extrém rezisztencia gént is azonosítottak. Ilyen a *S. hougasii* vad fajtából származó Ry_{hou} gén (Cockerham 1970), amely extrém rezisztenciát biztosít a PVY és PVA vírusokkal szemben, és a *S. chacoense* eredetű Ry_{chc} extrém rezisztencia gén is. Ez utóbbit Hosaka és munkatársai (2001) vizsgálták négy keresztezés, összesen 159 F₁ utódján. Munkájuk során egy RAPD markert azonosítottak (38-530), amely kapcsoltságot mutat (16,3 cM) a Ry_{chc} génnel. A gént később Sato és munkatársai (2006) a IX. kromoszómára térképezték.

2.8.1.2.1. *Solanum stoloniferum* eredetű PVY extrém rezisztencia gén (Ry_{sto})

A *S. stoloniferum* fajban azonosított gének ER-t vagy HR-t kontrollálnak a *Potyvirusok* támadásaival szemben. Az Ry_{sto}^{na} (Jones 1990, Barker 1997) és Ry_{sto}^{ma} (Cockerham 1970) gének extrém rezisztenciát biztosítanak a PVY és HR-t a PVA vírussal szemben. Az Ry_{sto}^{n1} ($=Ny_{sto}^1$) és a Ry_{sto}^{n2} ($=Ny_{sto}^2$) gének a PVY vírussal szemben kontrollálnak HR-t.

Az *Ry* gének között allélikus kapcsolatok, valamint kapcsoltságok állnak fenn, azonban ezek a viszonyok mind a mai napig nem tisztázottak teljes mértékben. Allélikus viszony van a *Ry_{sto}^{na}*, *Ry_{sto}^{rna}*, és a *Ry_{sto}ⁿ²* gének között, valamint a *Ry_{sto}* és a *Ry_{sto}ⁿ¹* gének között, míg a *Ry_{sto}^{na}* gént bizonyos keresztezésekben allélikusnak találták a *Ry_{sto}* génnel is. Korábbi megfigyelések arra engednek következtetni a *Ry_{sto}* és a *Ry_{sto}^{na}* lókuszok homeológok lehetnek a – néha autotetraploidként viselkedő - allotetraploidok megfelelő genomjaiban (Cockerham 1970).

Az *Ry_{sto}* gén extrém rezisztenciát szabályoz a PVY minden törzsével, illetve a burgonya-A és -V vírusokkal szemben is. A gént korábban egyetlen domináns génként jellemezték (Cockerham 1970), azonban Hämäläinen (1999) szerint a *S. stoloniferum* eredetű extrém rezisztenciát legalább két gén kontrollálja. Ross (1986) korábbi vizsgálataiban szintén arra a következtetésre jutott, miszerint az extrém rezisztencia hasadásában mindig jelentkező torzulás, különböző kis hatású gének jelenlétével magyarázható.

Elsőként Brigneti és munkatársai (1997) azonosítottak a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt AFLP markereket, amelyeket paradicsom (*Lycopersicon esculentum* és *Lycopersicon penellii* keresztezésből származó F₂ populáción) térképen (Bernatzky és Tanksley 1986; Paul et al. 1994) a XI. kapcsoltsági csoport *GP163* és *GP259* RFLP markerekkel határolt régiójába lokalizáltak. A burgonya és paradicsom között fennálló szinténiák (Bonierbale et al. 1988; Gebhardt et al. 1991; Tanksley et al. 1992) alapján feltételezték, hogy a gén hasonló pozícióban helyezkedik el a burgonyában is. A lokalizálás megerősítése érdekében a markert burgonyában is visszatérképezték, amely alátámasztotta a paradicsom térképen meghatározott pozíciót. A régió finomtérképezését követően egy BAC klónt is azonosítottak, amelyben mind a három, a génnel szorosan kapcsolt markert azonosítani tudták, azonban a transzformációs vizsgálatok eredményeiből arra következtettek, hogy a gén recesszív allélját izolálták (<http://www.cipotato.org/market/PgmRprts/pr95-96/program3/prog36.htm>). Gebhardt és Valkonen (2001) azonban feltételezik, hogy a téves gén izolálás oka, a növényanyag nem megbízható pedigréjében lehet.

Flis és munkatársai (2005) egy a *Ry_{sto}* géntől 13,7 cM-ra elhelyezkedő ISSR markert is azonosítottak, amelyet az előző munkával ellentétben a XII. kromoszómára térképeztek. A pozíció megerősítéséhez további négy a XII. kromoszómára térképezett RFLP markert alakítottak STS (*GP81*) vagy CAPS (*GP122*, *GP204*, *GP269*) markerré, amelyekkel szintén kapcsoltságot tudtak kimutatni. A két munka közötti különbséget a szerzők egyrészt Gebhardt és Valkonen (2001) feltételezésére hivatkozva a térképezéshez használt növényanyag eltérő pedigréjével magyarázzák, másrészt a két különböző térképpozíciót, mint új, a korábitól

eltérő lókuszt határozták meg. Az új lókuszt *Ry_{sto-f}*-nek nevezték el, mivel a növényeik fertilisek voltak annak ellenére, hogy a *Ry_{sto}*-val introgresszált növények általában hímsterilek (Flis et al. 2005).

Song és munkatársai (2005) dihaploid térképezési populációt használva 12, a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt AFLP markert azonosítottak, amelyeket - egy korábban ebbe a kapcsoltági csoportba lokalizált a *TG28* RFLP markertől (Gebhardt et al. 1991) 10 cM-ra elhelyezkedő SSR markerrel (*STM0003*) mutatott kapcsoltág alapján – a XII. kapcsoltági csoportba térképeztek. A marker detektálásához használt primerekkel azonban nem a várt méretű (141 bp) fragmentumot, hanem egy kisebb 111 bp méretű amplifikátumot azonosítottak, amelyet új lókuszként (*STM0003-111*) írtak le. A szerzők további, a XII. kapcsoltági csoportba térképezett SSR markerekkel, és a Flis és munkatársai (2005) által publikált markerekkel sem tudtak kapcsoltágot kimutatni, így az új lókuszt nem sikerült visszatérképezniük. Mindössze a *GP81* STS markerrel tudtak távoli 35 cM kapcsoltágot kimutatni. Ugyan a két tanulmány a gént hasonló pozícióba, a XII. kromoszóma rövid karjára lokalizálja, Song és munkatársai (2005) felvetik, hogy a két különböző térképhely eltérő géneket is reprezentálhat.

Heldák és munkatársai (2005) IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), illetve REMAP (Retrotransposon-microsatellite Amplified Polymorphism) technikákkal vizsgáltak PVY rezisztens és fogékony burgonya genotípusokat, valamint a Santé x C2264, és D4331 x Santé keresztezésekből származó a *Ry_{sto}* génre nézve hasadó F₁ vonalakat. A primereket a *Tst1* (*Ty1*-copia család), *PORE2* (*Ty3*-gypsy család), valamint a *SOL3* (*LINE* család) retrotranszpozonok szekvencia információi alapján tervezték. Két marker jelöltet azonosítottak a rezisztens bulkban, valamint a rezisztens utódokban, azonban ezek térképhely és géntől való távolsága nem ismert.

Később Witek és munkatársai (2006) multiplex PCR eljárást fejlesztettek ki, amely lehetővé teszi a *S. stoloniferum* eredetű PVY extrém rezisztencia gén (*Ry_{sto-f}*) valamint a *S. t. ssp. andigena* eredetű PVS rezisztencia gén (*Ns*) szimultán szelekcióját. Az eljárást a korábban közölt *Ns* génnel kapcsolt *SC811₄₅₄* (Marczewski et al. 2002) és a *Ry_{sto-f}* génnel kapcsolt *GP122* CAPS markerekre alapozták. Ez utóbbi marker kimutatásához a szerzők új primert párt fejlesztettek, amelynek használatával - EcoRV restrikciós emésztést követően - a korábban leírt 718 bp méretű fragmentum (Flis et al. 2005) helyett 564 bp méretű terméket kaptak. A két fragmentum kimutatásához használt primer párokból a reverz primerek szekvenciája teljesen különböző, míg a forward primerek csaknem azonosak. A különbség mindössze, hogy az 564 bp méretű fragmentum kimutatásához használt forward primer a 3' végén további négy nukleotidot tartalmaz.

2.9. Marker alapú szelekció (MAS)

Az intenzív molekuláris genetikai kutatások eredményeként mára számos – különböző génekhez kapcsolt - DNS marker áll rendelkezésünkre a marker alapú szelekció gyakorlati megvalósításához. A növényi térképek közül jelenleg a burgonyáé az egyik legjobban telített (Barone 2004), amelyen eddig több mint 25 egyszeres domináns gént lokalizáltak. Ezek nagy része valamilyen betegséggel szemben rezisztenciát kontrolláló gén.

A burgonyában elsőként térképezett *Gro1* rezisztencia génhez (Barone et al. 1990), és a *HI* (Gebhardt et al. 1993) génhez kapcsolt *CP56* és *CP113* RFLP markerek szekvenciája alapján Niewöhner és munkatársai (1995) PCR alapú STS markereket fejlesztettek, amelyeket sikeresen alkalmaztak 136 burgonya genotípus szelektálására. A burgonya - vírusokkal szembeni - rezisztencia nemesítésében marker alapú szelekciót ezidáig az *Ry_{adg}* gén esetén alkalmaztak. Hämäläinen és munkatársai (1997) az *Ry_{adg}* gént hordozó, diploid és tetraploid *Solanum* genotípusokat szelektáltak egy, a géntől 2 cM-ra térképezett RFLP markerrel (*TG508*). Vizsgálataik során nem azonosítottak a gén és a marker között rekombinációt mutató genotípusokat. Később a nagyobb hatékonyság és egyszerűbb használat érdekében a génnel koszegregáló rezisztencia gén-szerű (RGL) fragmentumokból - a szekvencia különbségek alapján - SCAR markereket fejlesztettek, amelyekkel 103 különböző genetikai háttérrel rendelkező diploid és tetraploid genotípust szelektáltak szintén 100%-os biztonsággal (Kasai et al. 2000, Barone 2004).

Gebhardt és munkatársai (2006) PCR alapú markerek szimultán alkalmazásával végeztek szelekciót négy, - az *Ry_{adg}*, *Rx1*, *Sen1* valamint a *Gro1* gének kombinálását célzó – összesen 110 F₁ genotípust tartalmazó keresztezésben. A szelekcióhoz, az *Ry_{adg}* génhez kapcsolt *RYSC3* (Kasai et al. 2000), az *Rx* génhez kapcsolt *CP60* CAPS (Bendahmane et al. 1997) markereket, valamint a *Gro1* gén specifikus primereket (Paal et al. 2004) és a *Sen1* génnel kapcsolatba hozható *NI25* cDNS (Hehl et al. 1999) szekvenciájára tervezett primereket (Bormann et al. 2004) alkalmazták. Ugyan a vizsgált populáció egyedszáma kicsi volt, a marker alapú szelekció minden esetben a rezisztencia tesztnek megfelelő eredményt mutatta.

A nemesítés szempontjából értékes tulajdonságok nagy része vad burgonya fajokból ered (Barone 2004), amelyeket interspecifikus keresztezésekkel introgressálnak a termesztett burgonyába. A bevinni kívánt célgénhez kapcsolt nem kívánatos tulajdonságok eliminációja azonban többszöri visszakeresztezéseket igényel, folyamatos szelekciós nyomás alatt.

Az adott génhez kapcsolt molekuláris markerek használatával az introgresszió folyamata lerövidíthető, mivel a célgénhez kapcsolt specifikus markerekkel meggyorsítható a rekurrens

genom visszanyerése (Hospital et al. 1992). Barone és munkatársai (2001) a *S. commersonii* vad faj hasznos tulajdonságainak a termesztett burgonyába beépítése során sikeresen alkalmazták, a Sebastiano és munkatársai (1999) által azonosított RFLP és RAPD markereket. Noha a fent említett vizsgálatok a molekuláris markerek szelekcióban történő sikeres alkalmazásáról számolnak be, felhasználásuk lehetősége a gyakorlati nemesítésben mégis ellentmondásos. Tan és munkatársai (2005) a fentieknek ellentmondó eredményekről számoltak be. 238 diploid és tetraploid burgonya genotípust vizsgáltak vad fajokból introgresszált fonálféreg és burgonyavész elleni rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerekkel. Az esetek nagy részében azonban vagy nem tudták azonosítani a markert, vagy a reakció során nem megfelelő méretű termék amplifikálódott. Eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy a burgonya heterozigótasága limitálja a markerek alkalmazhatóságát a gyakorlati nemesítésben. Hasonló eredményekre jutottak Kreuz és munkatársai (2005), akik az *RIMI* (Ballvora et al. 2002) markert ugyan sikeresen, de két további CAPS markert (*GP21*, *SPUD237*) (Meksem et al. 1995, De Jong et al. 1997) eredménytelenül alkalmazták az *RI* gén analízisére.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Növényanyag

3.1.1. Pedigré információk

A génnel kapcsolt markerek azonosításához és a térképezéséhez használt hasadó F₁ populációt a White Lady (WL) valamint az S440 nemesítési vonal keresztezésével állítottuk elő. A szülőpartnerek ugyan morfológiailag nagyon hasonlóak voltak a pedigréjük azonban teljesen különbözött. A keresztezésben - hímsterilitása miatt - anyai vonalként szereplő WL-t a keszthelyi Burgonyakutatási Központ-ban nemesítették és mint fajtát, 1994-ben ismerték el. A WL egyéb rezisztencia gének mellett a *S. stoloniferum* vad burgonya fajtából származó *Ry_{sto}* gént is hordozza, vagyis extrém rezisztenciával rendelkezik a PVY-al szemben, ugyanakkor extrém rezisztenciát mutat a PVA, és a PVV vírusokkal szemben is.

A WL-t a Ke40 és a 71.17/6 N+B nemesítési vonalak keresztezésével állították elő, ahol az anyai partnerként szereplő Ke40 vonal hordozta a *Ry_{sto}* gént. A Ke40 nemesítése során felhasznált, az egykori Nyugat-Németországból származó vonalak pedigréje a hiányos dokumentáció miatt nem pontosan ismert, így a PVY extrém rezisztencia forrást csak faj szinten ismerjük.

A WL komplex rezisztenciájának kialakítása során a nemesítők egyéb vad fajokat (*S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. acaule*, *S. demissum*, *S. verneii*) is felhasználtak, így a fajta - a fent említett rezisztencia tulajdonságai mellett - jó szántóföldi rezisztenciával rendelkezik a burgonya levélsodródás vírussal (PLRV) szemben, valamint rezisztens a gumóvarasodással, a burgonya fonálféreg *Ro1* és *Ro4* rassaival, és a lombfítoftórával szemben (magas fokú rezisztencia) is.

A keresztezésben pollen donorként szereplő S440 vonal (Wisconsin University, USA) - noha származása nem teljesen ismert - nem hordozza sem a *Ry_{sto}* gént, sem más vad burgonya fajtából származó PVY rezisztenciagént.

3.1.2. Hasadó populáció előállítás

A WL és S440 keresztezése során fogott magokból először palántákat neveltünk. A palántákat elültetve a növények alatt fejlődött gumókból egyet kiválasztva azt újból elültettük, így végül 195 F₁ genotípust kaptunk, a növények alatt fejlődött gumók számától függően 1-11 egyeddel. A növényeket vektormentes üvegházban, 20-23°C hőmérsékleten, természetes megvilágítás mellett neveltük.

3.1.3. A markerek alkalmazhatóságának vizsgálatához felhasznált fajták

A markerek alkalmazhatóságának ellenőrzésére több magyar, holland és német fajtát is bevontunk a vizsgálatokba. A fajták egy része különböző vad *Solanum* fajokból származó PVY extrém rezisztencia gént hordoz, míg másik részük fogékony a vírusra. A Bettina, Ciklámen, Góliát, Hópehely, Kánkán, Loretta, Luca XL, Rioja, Santé, Vénusz fajták a *Ry_{sto}* gént hordozzák, míg az Aladin, Cleopatra, Dura, Kondor, Kuroda, Ratte, Somogyi sárga kifli, Stirling, és Viktoria fajták fogékonyak a PVY-ra. A Pannónia és Rachel fajták a *S. chacoense* vad fajtából származó *Ry_{che}* extrém rezisztencia gént hordozzák.

3.1.4. *Solanum stoloniferum* származékok

A marker szekvenciák eredetének megállapítása, valamint a keszthelyi nemesítési anyagokban és fajtákban szereplő *Ry_{sto}* gén eredetének vizsgálata érdekében különböző, ismert PVY rezisztencia tulajdonságú *S. stoloniferum* származékokat is megvizsgáltunk, melyeket a németországi Gross-Lüsewitz Burgonya Génbank bocsátott rendelkezésünkre. A nyolc származékból öt rezisztens, (génbanki szám: 68, 528, 536, 620, 766), míg három fogékony (génbanki szám: 509, 533, 545) volt.

3.1.5. A markerek alkalmazhatóságának ellenőrzéséhez felhasznált populációk

A markerek alkalmazhatóságát megvizsgáltuk egy - jó chips tulajdonságokkal és PVY extrém rezisztenciával rendelkező - új fajta előállítására irányuló nemesítési program keretében végzett, három keresztezés F₁ utódain, valamint a WL és S440 között készített újabb keresztezés eredményeként kapott 502 F₁ genotípuson is.

A keresztezésekben felhasznált két magyar fajta (WL, Rioja) hordozza a *Ry_{sto}* gént, míg a német Impala, valamint a két amerikai nemesítési vonal (S440, S438) fogékony a vírusra. A keresztezésükkel előállított populációk tehát hasadtak a *Ry_{sto}* génre nézve. A *Ry_{sto}* gént tartalmazó fajtákat - citoplazmás hímsterilitásuk miatt - anyai partnerként használtuk a keresztezésben. A keresztezéseket három különböző kombinációban végeztük, amelyek a következők voltak: WL x S438, Rioja x S440, WL x Impala. A WL x S438 keresztezése során 19 F₁ genotípust, míg a WL x Impala és Rioja x S440 keresztezések eredményeként 79 és 91 F₁ genotípust kaptunk. A keresztezésben felhasznált fajták és vonalak tetraploidok voltak, és a korábbi vizsgálataink eredményei alapján a rezisztens fajták szimplex állapotban hordozták a *Ry_{sto}* gént.

A növényeket – hasonlóan a térképező populáció vonalaihoz – vektormentes üvegházban, 20-23°C hőmérsékleten, természetes megvilágítás mellett tartottuk fenn.

3.1.6. A növények in vitro fenntartása

A térképezési populáció minden egyedét valamint a fajtákat in vitro is fenntartottuk, hormonmentes MS (Murashige – Skoog, 1962) táptalajon, 4-6 hetenkénti passzálással. Az 500 ml-es nevelőedényekbe 50 ml, 0,8 % bakteriológiai agarral szilárdított táptalaj (pH 5,8) került. A passzálások során 2-3 rügyes szárdarabokat helyeztünk a táptalajra, és 3-5 hét után a rügyekből fejlődő új hajtások leveleit használtuk fel a DNS tisztításhoz. A növényeket 22°C nappali, illetve 18°C éjszakai hőmérsékleten, 10 órás 3000 lm x m² megvilágítás mellett neveltük.

3.2. PVY rezisztencia vizsgálata

3.2.1. Fertőzés

A fertőzési tesztek során a WL x S440 keresztezésből származó 195 F₁ genotípus minden egyedét 4-6 leveles állapotban, gumószámtól függően de legalább három ismétlésben mechanikailag inokuláltuk a PVY^{NTN} törzsének D₁₀ izolátumával (karborundum por, puffer, vírus szuszpenzió), amelyet dohányban (*Nicotiana tabacum Xanthi-nc*) tartottunk fenn. A tüneteket a fertőzést követő 4., 5., és 6. héten felvételeztük. Mivel a különböző egyedekben a vírus eltérő mértékben szaporodhat, így egyes növényekben már a fertőzést követő negyedik, míg másokban csak a hatodik héten válik a víruskoncentráció olyan mértékűvé, hogy az látható tüneteket produkál, és vírus DAS-ELISA-val is kimutatható.

Mindegyik a 4. héten - a PVY fertőzésre jellemző - szimptomát mutató növényt a fogékony genotípusok közé soroltunk, míg a tünetmentes növényeken elvégeztük a szerológiai vizsgálatot. A pozitív, tehát a vírust küszöbérték feletti koncentrációban tartalmazó növényeket, szintén a fogékony genotípusba soroltuk. A rezisztens növényeket tovább vizsgálva a szimptomatológia és a szerológiai vizsgálatokban, csak az ötödik, majd a hatodik héten is rezisztensnek mutató növényeket soroltuk az extrém rezisztens genotípusok közé.

3.2.2. DAS-ELISA teszt

A vírus detektálására alkalmazott szerológiai módszer a DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Clark és Adams 1977) volt. A vizsgálatot a Löwe Biochemica GmbH. poliklonális antitesteket tartalmazó kitjével (Cat. No. 07038) a gyártó útmutatásai alapján végeztük. A reakció során bekövetkező színintenzitás változást EPD-1 fotométerrel mértük. A vizsgálatban kapott extinkciós értékekből a vak próbák átlagát

levonva (a vak próba csak puffert tartalmaz, annak ellenőrzésére, hogy a reakció végbement-e), a kapott értéket a számított fertőzési küszöbértékhez viszonyítottuk. A fertőzési küszöbérték számítása a következő képlettel történt: $K_f = [(X_{n-max} - X_{n-min}) \times 3] + \bar{x}_n$, amelyben K_f = Fertőzési küszöbérték, X_{n-max} = Legmagasabb negatív kontroll, X_{n-min} = Legalacsonyabb negatív kontroll és a \bar{x}_n = negatív kontroll átlaga.

Amennyiben egy adott minta extinkciós értéke meghaladta a számított fertőzési küszöbértéket, a genotípust fogékonyak osztályoztuk. A szerológiai vizsgálat során csak azokat a genotípusokat tekintettük rezisztenseknek, amelyeknek minden egyede negatív volt; míg azokat, amelyek akár egy pozitív eredményt mutató egyedet is tartalmaztak, a fogékony genotípusok közé soroltunk.

Az egyetlen egyedet tartalmazó genotípusokat, a rezisztencia tesztek eredményétől függetlenül kihagytuk a további vizsgálatainkból.

3.3. Molekuláris analízis

3.3.1. DNS tisztítás

A növényekből a DNS-t Walbot és Warren (1988) eljárása alapján izoláltuk, amelyen kisebb módosításokat végeztünk. Az *in-vitro* növények leveleit (100 mg) folyékony nitrogén jelenlétében porrá zúztuk, majd 1,5 ml lízis puffert (15% szacharóz, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM EDTA (pH 8.0) 500 mM NaCl) adtunk hozzá. Egy centrifugálást követően a folyadékot a mintákról eltávolítottuk. A csapadékhoz 300 µl 20T-10E puffert [(20 mM Tris HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] és 20 µl 20%-os SDS-t adtunk, majd 70°C-on 15 percig inkubáltuk. 150 µl 7,5M ammónium-acetát hozzáadása után a mintákat 30 percre jégre tettük. Centrifugálást követően a felső tiszta réteget tiszta Eppendorf csövekbe pipettáztuk, és azonos mennyiségű izo-propanolt hozzáadva 15 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Újabb centrifugálás után a folyadékot eltávolítottuk, és a DNS-t 500 µl TE pufferben visszaoldottuk. CIA (kloroform:izoamil-alkohol = 25:1) kezelést követően, 40 µl 5M-os nátrium-acetátot és 1ml etanolt adtunk a mintákhoz, majd újból centrifugáltuk. Végül, 70% etanolos tisztítás után, a DNS csapadékot TE pufferben visszaoldottuk.

3.3.2. Csoportok képzése és RAPD analízis

A szegregáló populáció egyedeiből – a szerológiai vizsgálatokban kapott eredményeknek megfelelően - 10 PVY rezisztens és 10 a vírusra fogékony növényt véletlenszerűen kiválasztva, majd azok levélmintáit egy mintaként kezelve rezisztens és fogékony csoportokat

képeztünk. Később a csoportot alkotó egyedek számát 25-25-re emeltük. A DNS-t a 3.3.1 fejezetben leírtak szerint izoláltuk, a felhasznált anyagok mennyiségét a minta tömegének megfelelően arányosan megnövelve.

A RAPD analízis során a PCR reakciót mintánként 20 µl reakció eleggyel végeztük, amely a következő komponenseket tartalmazta: 20 ng templát DNS, 2 mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 mM 10x PCR puffer [(1 x 10 mM TrisHCl, (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl és 0,1% Triton X-100)], 20 pM a primer pár mindkét tagjából (Sigma Genosys Ltd.), és 0,4 Unit Dynazyme DNS polymeráz enzim (Finnzymes Oy, Finland).

A PCR reakciók során primer párokat alkalmaztunk, mivel korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy így nagyobb számú polimorfizmust tudunk detektálni. 97 primer, mintegy 3000 kombinációjával teszteltük végig a két csoportot, valamint a szülők DNS mintáit. A primereket a reakciókban úgy párosítottuk, hogy azok egymással ne legyenek komplementerek. A PCR reakciót a következő profil szerint végeztük: 1 ciklus 94°C, 1 perc, majd ezt követte 35 cikluson át 94°C 30 másodperc, 37°C 1 perc, 72°C 2 perc, a végső extenzió 72°C 10 perc volt.

A RAPD analízishez felhasznált primerek szekvenciáit a függelék 1. táblázata tartalmazza.

3.3.3. Elektroforézis, gél értékelés

A 20 µl PCR termékeket 5 µl BPB-vel (Brome-Phenol Blue Xylene Cyanol) festettük, majd az PCR reakció során kapott termékeket 20 cm x 16,5 cm-es, 1,5%-os agaróz (Promega) gélen, 0,5x TBE (Tris-HCl-Boric acid-EDTA) pufferben választottuk szét (220V 1,5 óra). A géleket 20 percig ethidium-bromidot tartalmazó TE pufferben (85 µl/1000ml) festettük. A mintázatot folyó csapvizet öblítést követően, a Syngene GeneGenius gél dokumentációs rendszerével detektáltuk és értékeltük.

3.3.4. Intron-targeting analízis

3.3.4.1. Primer tervezés

Az intron-targeting módszer során százhuszonkilenc primer párt terveztünk, az adatbázisokban elérhető már klónozott - tehát ismert szekvenciájú - burgonya gének, illetve egyéb burgonya szekvenciák (EST, mRNS, cDNS) alapján. A klónozott gének esetén a primereket az intronokat közrefogó exonokra terveztük úgy, hogy azok az intront amplifikálják. Egyéb szekvenciáknál, mivel az intronok helye nem ismert ezért a szekvenciákkal homológia keresést végezve a primereket a valószínűsíthető intront határoló exon régiókra terveztük. A primerek tervezéséhez a *Primer3* szoftvert

(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) használtuk. A tervezett primer párok szekvenciáját a függelék 2. táblázata tartalmazza.

3.3.4.2. PCR reakció és gélelektroforézis

A vizsgálatok során használt PCR reakcióelegy összetétele megegyezett a RAPD vizsgálatnál leírtakkal, míg a reakciót a következő profil szerint hajtottuk végre: 94°C 3 perc 1 ciklus, ezt követte 35 cikluson keresztül 94°C 1 perc, a primer párnak megfelelő kapcsolódási hőmérsékleten 1 perc majd 72°C 1 perc. A végső extenzió 72°C 7 perc volt.

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk, a primerek valóban azt a fragmentumot amplifikálták amelyekre azokat terveztük, elvégeztük a PCR során kapott termékek resztrikciós emésztését. Ennek során – a Webcutter V2.0 szoftver segítségével (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) – elkészítettük a fragmentum resztrikciós térképét, majd három különböző resztrikciós enzimmal elvégeztük az emésztést a gyártó útmutatásainak megfelelően. A fragmentumokat a 3.3.3 fejeztben leírtak szerint választottuk szét.

3.3.5. Funkcionális markerek vizsgálata

A RAPD marker lókuszok és a gén térképi helyének meghatározásához – más kutatócsoportok eredményét figyelembe véve (Brigneti et al. 1997, Flis et al. 2005, Song et al. 2005) - leteszteltük a Chen és munkatársai (2001) által a XI. kapcsoltsági csoportba térképezett *Dbe*, *SutI*, *Tall*, *ShkB*, és a XII. kapcsoltsági csoportokba lokalizált *Sus4*, valamint *Ppe* CAPS markereket (Függelék 3. táblázat) a térképező populációnkon. A PCR reakciót, és a resztrikciós emésztését (*TaqI*, *RsaI*, *AluI*) a szerzők által leírtak szerint végeztük. Az elektorforézist a RAPD vizsgálatokkal megegyező kondíciók szerint végeztük.

3.3.6. Mikroszatellit analízis

A markerek kromoszómális lokalizálásához Milbourne és munkatársai (1998) által fejlesztett, a burgonya XI. (*STM0037*, *STM1009*, *STM2005*, *STM0025*), valamint XII. kromoszómájára térképezett (*STM0003*, *STM0007*, *STM0032*, *STM0030*, *STM0014*, *STM0040*, *STM1045*, *STM2028*) SSR markereket is felhasználtuk. A PCR reakciót a szerzők leírása alapján végeztük. A felhasznált primerek szekvenciáit a függelék 4. táblázata tartalmazza. A PCR termékeket agaróz gélen történt ellenőrzés után MetaPhore (Cambrex, USA) gélen választottuk szét. A géleket ethidium-bromiddal festettük, majd a Syngene GeneGenius géldokumentációs rendszerével detektáltuk, és értékeltük.

3.3.7. *Ry_{sto}* génhez kapcsolt egyéb markerek alkalmazhatósága

3.3.7.1. *AFLP* markerek vizsgálata

A Brigneti és munkatársai (1997) által azonosított négy, a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt AFLP markert (*M17*, *M45*, *M5*, *M6*) jelenlétét az általunk előállított hasadó populációban is megvizsgáltunk. A vizsgálathoz az Analysis System I (GIBCO BRL) kitet használtuk. A DNS emésztését (*MseI* és *PstI* resztrikciós endonukleázok), a preszelektív és szelektív amplifikációt a szerzők, valamint a gyártó útmutatásai alapján végeztük. A markerek kimutatásához használt primer párok szekvenciái a függelék 5. táblázatában láthatók.

A termékeket denaturáló polyacrilamid gélen választottuk szét, a mintázatot ezüst-nitrátos festéssel tettük láthatóvá, a következő eljárás szerint: 20 perces fixálást követően (50% metanol, 10% ecetsav), a gélt 20 percig ekvilibráltuk (5% metanol, 7% ecetsav), majd 3-szor 20 perces vizes öblítés után, 20 percig festettük (0,1%-os ezüst-nitrát). Az előhívás (3%-os Na-karbonát, 0,05% formaldehid) után a folyamatot 10%-os ecetsav-oldattal állítottuk le. A kapott mintázatot a Syngene GeneGenius géldokumentációs rendszerrel értékeltük.

3.3.7.2. *STS* és *CAPS* markerek vizsgálata

A vizsgálataink során leteszteltük egy időközben megjelent, lengyel kutatócsoport által publikált, az *Ry_{sto}* génnel kapcsolt *STS* (*GP81*) valamint *CAPS* markereket (*GP122*, *GP204*, *GP269*) is. A PCR reakciót ebben az esetben is a szerzők leírása alapján végeztük. A *CAPS* markerek kimutatásához szükséges resztrikciós emésztést a szerzők által leírt resztrikciós endonukleázokkal (*EcoRV*, *DdeI*, *TaqI*) (New England BioLabs) - a gyártó útmutatásai alapján végeztük. Az elektroforézis és a mintázat detektálása a 3.3.3. fejezetben leírtak szerint végeztük. A markerek kimutatásához használt primerek szekvenciáit a függelék 6. táblázata tartalmazza.

Később Witek és munkatársai (2006) új primer párt közöltek a *GP122* marker kimutatásához, amellyel – a megfelelő resztrikciós emésztést követően (*EcoRV*) - a Flis és munkatársai (2005) által leírtakkal ellentétben nem 718 bp hanem egy kisebb 564 bp méretű szakaszt azonosítottak. Ezért a *GP122₅₆₄* markert is megvizsgáltunk az általunk előállított hasadó populációban.

A PCR reakciót a szerzők általa leírt összetétel és profil szerint végeztük el. A reakcióhoz használt primerek szekvenciája a következő volt:

GP122₅₆₄ forward: 5'-TATTTTAGGGTACTTCTTTCTTATGTT-3'

GP122₅₆₄ reverz: 5'-CTGTCAAAAAAATCACTTGCATAACTAC-3'

A PCR során kapott termékeket agaróz gélen visszaellenőriztük, majd a sikeres amplifikációt követően elvégeztük a termékek restriktációs emésztését a szerzők által leírt enzimmal a gyártó útmutatásai szerint. Az emésztés után kapott termékeket a RAPD vizsgálatoknál (3.3.3. fejezet) leírtak szerint választottuk szét.

Song (2004) egy - a génhez szorosan kapcsolt - AFLP marker szekvenciája alapján három specifikus primerpárt tervezett, amelyekből kettő alkalmasnak bizonyult a PVY rezisztens és fogékony genotípusok szelekciójára. A MAS gyakorlati megvalósítása érdekében megvizsgáltuk ezek alkalmazhatóságát az általunk készített keresztezésekben is. A PCR reakciót a szerzők által leírt profil szerint, a függelék 7. táblázatában közölt primerek felhasználásával hajtottuk végre. Az amplifikátumok szétválasztása és kimutatása a fentebb leírtaknak megfelelően történt.

3.3.8. A Ry_{adg} specifikus SCAR marker vizsgálata a Ry_{sto} gént hordozó genotípusok szelekciójában

Brigneti és munkatársai (1997) a Ry_{sto} gént a XI. kromoszóma rövid karjának abba a régiójába térképezték, ahova Hämäläinen és munkatársai (1997) a *S. t. ssp. andigena* eredetű extrém rezisztencia gént (Ry_{adg}) lokalizálták. Megvizsgáltuk, hogy a Ry_{adg} génhez fejlesztett SCAR marker (Kasai et al. 2000) kapcsolt-e a hasadó populációinkban jelenlévő Ry_{sto} génnel. A PCR reakciót a szerzők által leírt kondíciók szerint, a 3.3.3s (5'-ATA CAC TCA TCT AAA TTT GAT GG-3'), és az ADG23R (5'-AGG ATA TAC GGC ATC ATT TTT CCG A-3') specifikus primer párok használatával végeztük. A gélelektroforézist ebben az esetben is a RAPD vizsgálatokkal megegyező módon hajtottuk végre.

3.3.9. Kapcsoltsági analízis

A markerek legvalószínűbb sorrendjének, valamint egymástól és a géntől való távolságának meghatározásához a JoinMap (Stam és Van Ooijen 1995), valamint a Scottis Crop Research Institute által tetraploid genomok térképezésére kifejlesztett TetraploidMap szoftvert használtuk (Luo et al. 2001). A TetraploidMap szoftvert a program készítői bocsátották rendelkezésünkre.

3.3.10. RAPD marker szekvenálása és specifikus primerek tervezése

A RAPD markereket reprezentáló DNS szakaszokat az agaróz gélből kivágtuk, és SpinPrep Gel DNA Kit-tel (Novagen), a gyártó útmutatásai alapján tisztítottuk. A kapott DNS szakaszokat a marker detektálásához használt primer párokkal újból felszaporítottuk, majd elektroforézissel ellenőriztük, hogy a megfelelő amplifikátumot izoláltuk-e. A marker fragmentumokat a PCR termékből közvetlenül szekvenáltattuk, amelyet a gödöllői Biotechnológiai Kutató Központban, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer rendszerrel végeztek el.

A szekvenálás után kapott bázissorrend alapján a Primer3 szoftverrel (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) specifikus primereket terveztünk a marker fragmentumok specifikus amplifikációjához, és így a gyakorlatban könnyen alkalmazható szelekciós rendszer megvalósításához.

3.3.11. Homológia vizsgálat

A markerek szekvencia információi alapján homológia keresést végeztünk, amely információt szolgáltat a marker fragmentumok eredetéről, struktúrájáról, esetleg alternatív eszköze lehet a markerek lokalizálásának. A homológia kereséshez a DDBJ (DNA DataBank of Japan) valamint a BlastX nyilvános adatbázisokat használtuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A fertőzési tesztek eredményei

A White Lady és S440 keresztezésből fogott magokból növényeket neveltünk, majd az alattuk fejlődött gumókat elültetve az egyes genotípusokat felszaporítottuk. Az így kapott klónokon - az elérhető gumószámtól függően, de legalább három ismétlésben - elvégeztük a rezisztencia teszteket.

A mechanikai inokulációt követő negyedik, ötödik és hatodik héten végzett szimptomatológiai vizsgálatok során, a PVY fertőzésre jellemző tünetegyüttesből pl.: a levelek deformációja, érnekrózisa, vagy mozaikossága kizárólag ez utóbbit tapasztaltuk a fertőzött, fogékony növényeken. A rezisztens növényeken – a vártak megfelelően - nem tapasztaltunk sem lokális, sem szisztemikus tüneteket.

Mindegyik az inokuláció hatására tünetet produkáló növényből a vírust DAS-ELISA vizsgálattal is ki tudtuk mutatni, míg a rezisztens növényekben a vírus koncentráció a számított küszöbérték alatt maradt. Tizennyolc F_1 genotípust azonosítottunk, amelyekben az egyes klónok eltérő abszorbancia értéket mutattak. Némely klónban a fertőzési küszöbérték feletti, míg másokban extrém alacsony abszorbancia értéket detektáltunk. Ezeket a genotípusokat az anyag és módszerben leírtak szerint a fogékony genotípusok közé soroltuk.

A fogékony egyedekben a vírus koncentráció átlagosan harmincszorosa volt a rezisztens egyedekben detektált abszorbancia értéknek. Mivel minden F_1 genotípusból több klónt is fertőztünk ezért genotípusonként egy átlagos abszorbancia értéket (\bar{x}_{absz}) is számítottunk.

Adott \bar{x}_{absz} értékhez az azt mutató F_1 genotípusok számát hozzárendelve, két egyértelműen elkülöníthető maximumot azonosítottunk, tehát a rezisztencia bimodális hasadást mutat. A két maximum a két különböző fenotípus osztálynak (rezisztens:fogékony) felel meg.

A rezisztencia tesztek során – a két csoportnak megfelelően - 95 rezisztens és 100 fogékony egyedet különítettünk el (Függelék 8. táblázat), amely - a burgonyában előforduló különböző öröklődési modellekre statisztikailag tesztelve - szignifikánsan 1:1 hasadási arányt mutat ($\chi^2=0,082$; $0,70 < P < 0,90$). A gén tehát simplex formában van jelen a tetraploid WL genomjában, melynek genotípusa így a rezisztencia génre nézve 'Rrrr' míg a fogékony apai partner genotípusa 'rrrr' volt.

4.2. Molekuláris vizsgálatok eredményei

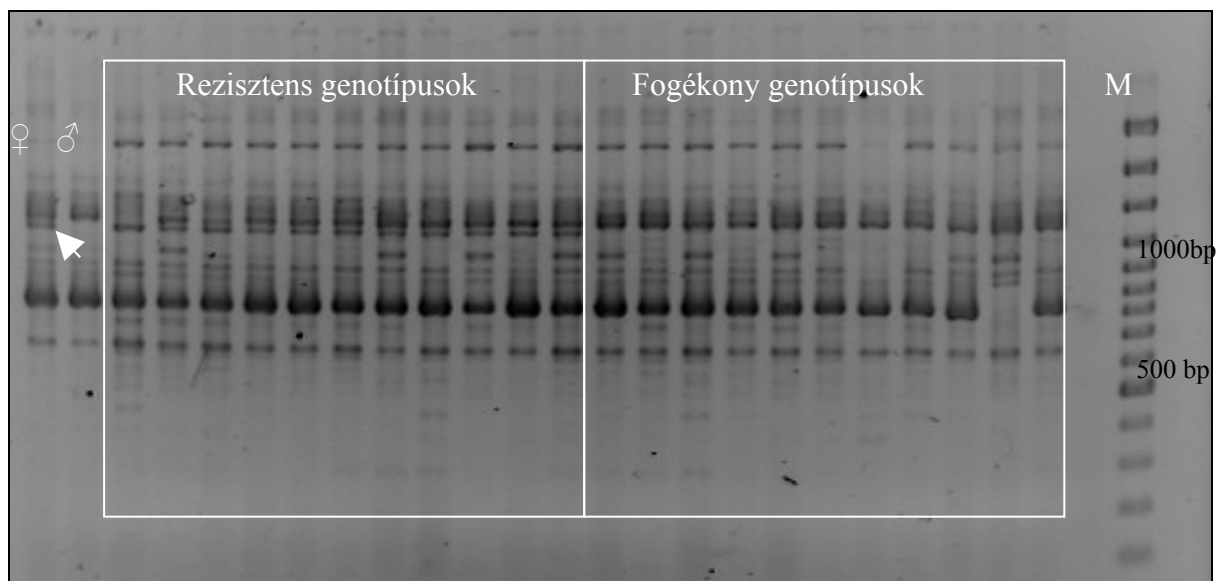
4.2.1. Markerezés és térképezés eredményei

4.2.1.1. Csoport analízis, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analízis

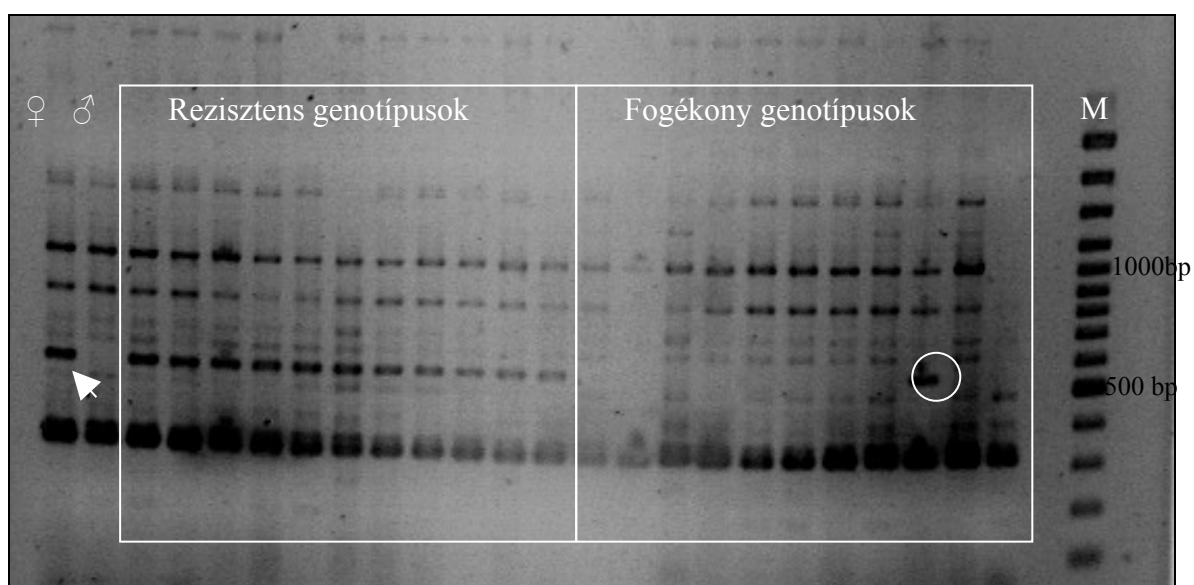
A fertőzési tesztek és szerológiai vizsgálatok során kapott rezisztencia tulajdonságok alapján a növényekből rezisztens, valamint fogékony csoportokat képeztünk. Mindkét csoportból 10-10 egyedet véletlenszerűen kiválasztva izoláltuk az összgenomi DNS-t. A két csoport között azonosított polimorf fragmentumokat a szegregáló populáció egyedein tesztelve azonban nem tudtunk a génnel még távoli kapcsoltságot mutató markert sem azonosítani. Ezért egy második analízist is végeztünk, amelyben a csoportokat alkotó egyedek számát 25-25-re emeltük. A nagyobb számú egyedet tartalmazó csoportokat mintegy 3000 primer kombinációval tesztelve, több mint 100 polimorf PCR terméket kaptunk. Egyes fragmentumok esetén a polimorfizmus nem az adott PCR termék meglétében vagy hiányában, hanem annak intenzitásában jelentkezett a két csoport között. Ez azt sugallta, hogy az amplifikátumot a bulk nem minden egyede tartalmazza, így lehetséges, hogy az egyedek közé a random kiválogatás során az adott (a polimorfizmust mutató) fragmentumra nézve rekombináns egyed(ek) került(ek), így ezeket is marker jelöltekként vizsgáltuk tovább.

Az analízis során végül öt jól ismételhető markert azonosítottunk a rezisztens szülőben, amelyek hasadása kapcsolatot mutatott a PVY rezisztenciájával.

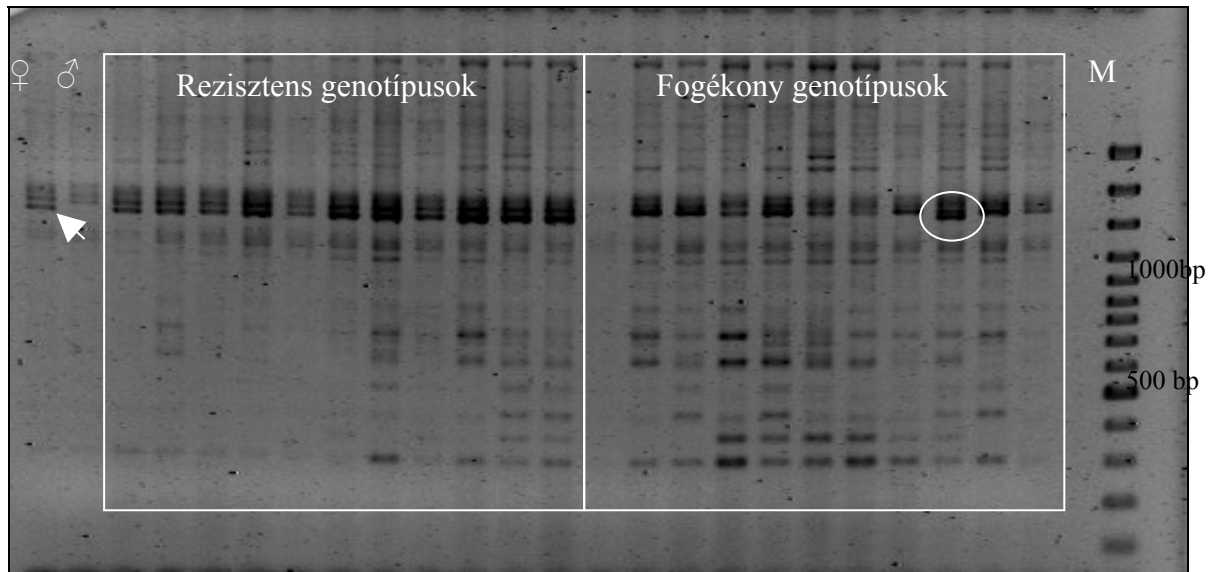
A marker jelölteket a hasadó populáció egyedein tesztelve végül megállapítottuk, hogy a *Ry_{sto}* génhez legközelebb a *RAPD9621* marker (1. ábra) térképeződött, attól mitegy 0,53 cM genetikai távolságra. További két markert – a *RAPD6846* (2. ábra.) és a *RAPD9607* (3. ábra.) lókuszokat – 3,03 cM valamint 5,84 cM távolságra lokalizáltunk a géntől. A *RAPD7039* lókusz (4. ábra) 9,13 cM genetikai távolságot mutat a géntől. Ez a négy marker a génnek ugyanazon az oldalán helyezkedik el (6. ábra).



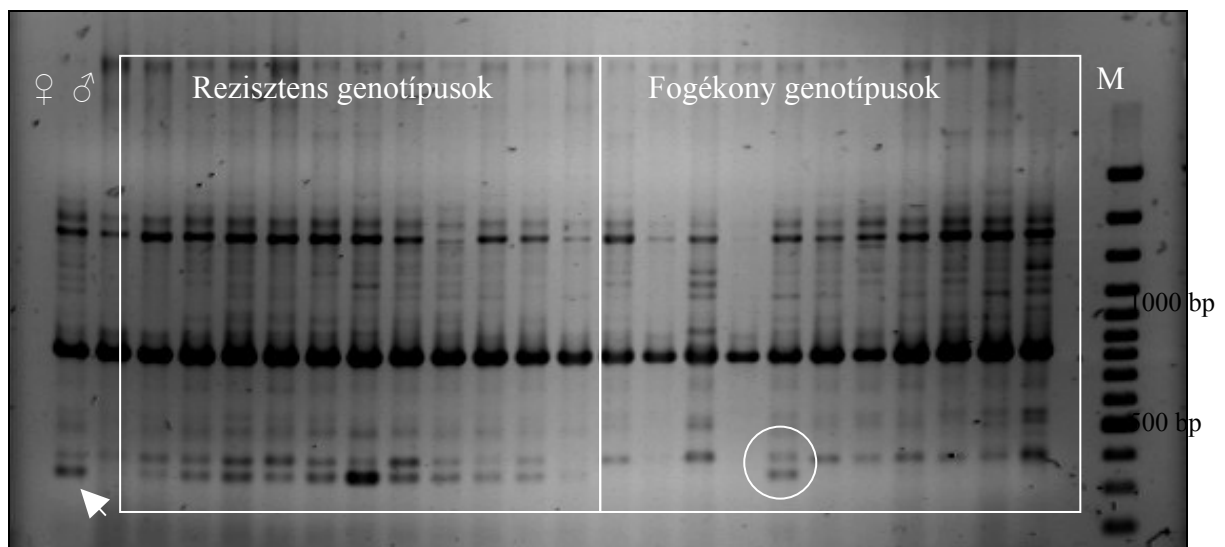
1. ábra: A *RAPD9621* marker a két szülőn (WL: ♀ S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a marker fragmentumot. M: 100 bp GeneRuler súlymarker (Fermentas, Litvánia).



2. ábra: A *RAPD6846* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a marker fragmentumot. A bekarikázott fragmentum rekombinációs eseményt jelöl. M: 100 bp GeneRuler súlymarker (Fermentas, Litvánia).



3. ábra: A *RAPD9607* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a marker fragmentumot. A bekarikázott fragmentum rekombinációs eseményt jelöl. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).



4. ábra: A *RAPD7039* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a marker fragmentumot. A bekarikázott fragmentum rekombinációs eseményt jelöl. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).

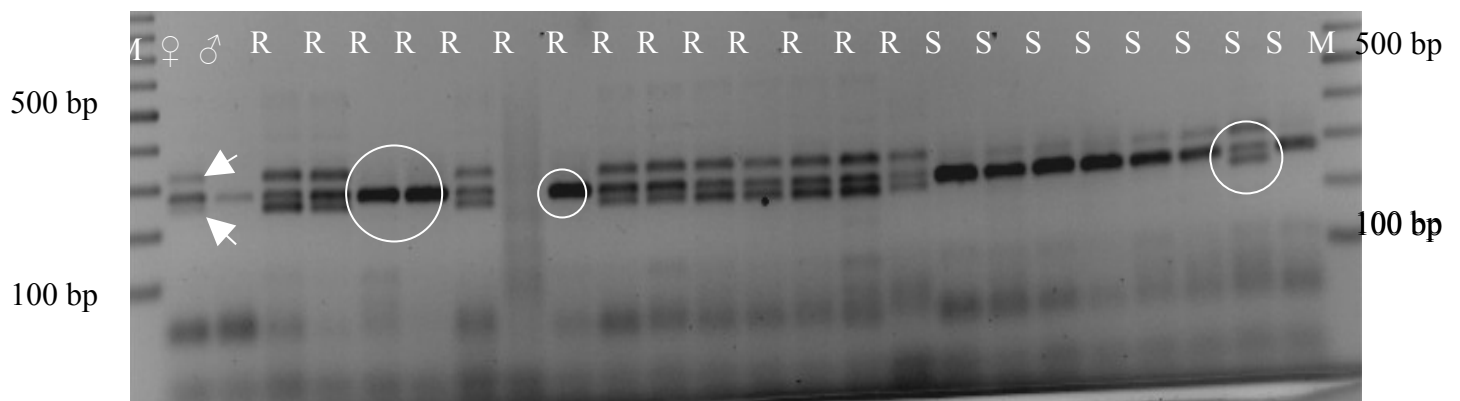
Az ötödik markert ezekkel szemben elhelyezkedő *RAPD832-2* lókuszt, 28,94 cM genetikai távolságot mutat a géntől.

A markerek összesen tehát 37,9 cM genetikai távolságot fednek le. Mindegyik fragmentum - a *Ry_{sto}* génhez hasonlóan - szimplex állapotban van jelen a rezisztens szülőben.

A markerek pontos helyzetének, és sorrendjének meghatározása érdekében a JoinMap programmal (Stam és Van Ooijen 1995) szoftveres analízist végeztünk. Mivel mindegyik marker szimplex állapotban van jelen a rezisztens szülőben (simple dose fragment = SDF) ezért ezek a fragmentumok genetikai tekintetben ugyanúgy viselkednek a tetraploidokban, mint a diploidokban (Kriegner et al. 2003), tehát a standard módszerekkel térképezhetőek. Eredményeink szerint a RAPD markerek egy kapcsoltsági csoportba térképeződtek a *Ry_{sto}* génhez viszonyítva cisz (coupling) helyzetben. A markerek, program által meghatározott sorrendjét, valamint a génhez viszonyított helyzetüket a 6. ábra szemlélteti.

4.2.1.2.1. Intron-targeting vizsgálatok eredményei

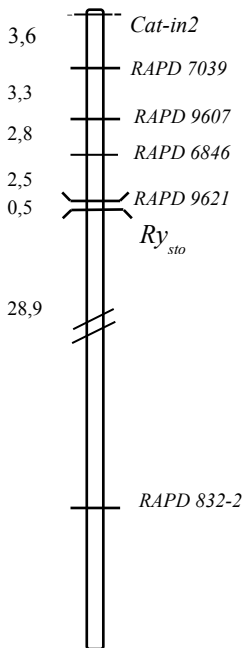
Az intron-targeting analízis során tervezett 129 primer párt (Függelék 2. táblázat), első lépésben a térképező populáció két szülőpartnerén, és hat F₁ egyeden teszteltük polimorfizmus azonosítás céljából. A primer párok mindegyike legalább egy fragmentumot amplifikált. Harmincnégy primer pár esetén azonosítottunk hossz-polimorfizmust, melyeket mint marker jelöltek a hasadó populáció F₁ genotípusain tovább vizsgáltunk. Végül, a burgonya kataláz génjének (Z37106) 2. intronjára tervezett primer pár amplifikált egy 320 bp méretű fragmentumot (*Cat-in2*), amely kapcsolatot mutat a *Ry_{sto}* génnel (5. ábra).



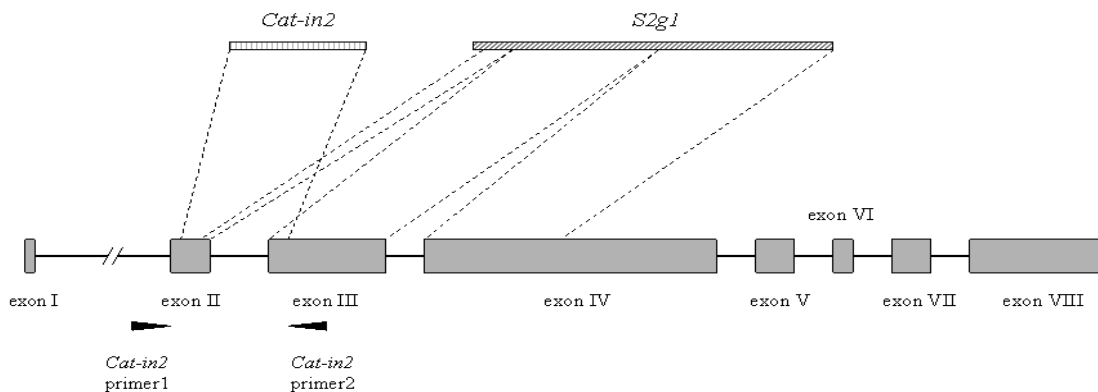
5. ábra: A *Cat-in2* marker amplifikációs mintázata a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) és 14 rezisztens valamint 8 fogékony F₁ genotípuson. A nyílak jelölik a marker fragmentumokat. A bekarikázott fragmentum rekombinációs eseményt jelöl. M: 100 bp GeneRuler súlymarker (Fermenta, Litvánia).

A marker – a hasadó populáció egyedein megvizsgálva – 12,5 cM genetikai távolságra térképeződött a géntől a *RAPD7039-RAPD9621* markerekkel azonos oldalra (6. ábra.).

6. ábra: A markerek egymáshoz, és a génhez viszonyított helyzete. A bal oldali számok a markerek közötti távolságokat jelölik cM-ban feltüntetve.



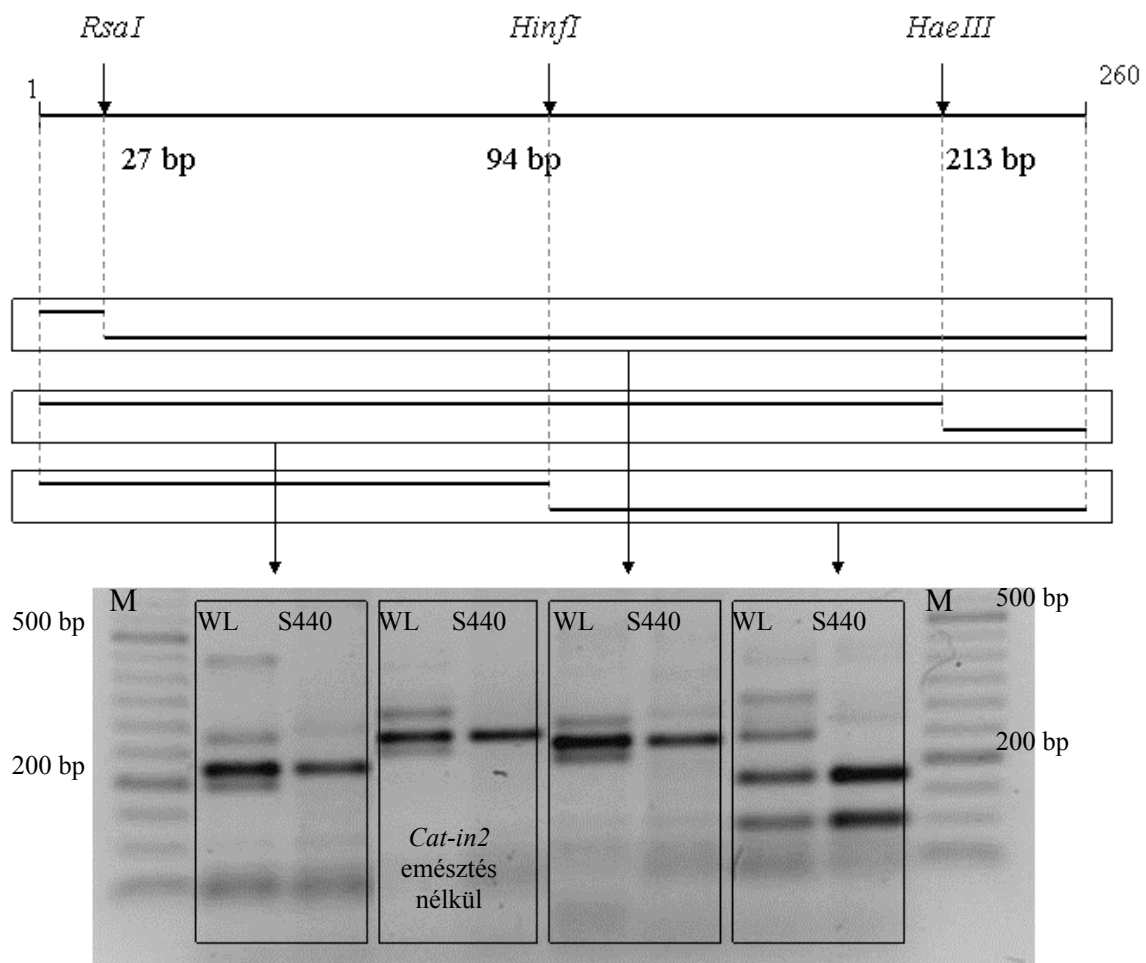
Mivel a kataláz gén pozíciójáról irodalmi adatok nem álltak rendelkezésre, ezért homológia vizsgálatot végeztünk, hogy megállapítsuk, mutat-e szekvencia hasonlóságot esetleg azonosságot egyéb szintenikus fajok ismert pozíciójú génjeivel vagy szekvenciáival. A vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a marker-szekvenciát tartalmazó kataláz gén korábban a burgonya XII. kromoszómájára térképezett *S2g1* (Gebhardt et al. 2003) lókuszt is tartalmazza (7. ábra). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy hasonlóan az *S2g1* markerhez, a *Cat-in2* marker is a XII. kromoszómán lokalizálódik.



7. ábra: A kataláz gén szerkezete, valamint a *Cat-in2* és *S2g1* markerek fragmentumok elhelyezkedése.

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk a primerek valóban azt a fragmentumot szaporították fel amelyekre azokat terveztük, elkészítettük a *Cat-in2* marker restrikciós térképét. A szoftveres analízis során 24 vágási helyet azonosítottunk a fragmentumon, melyekből három a laboratóriumunkban is rendelkezésre álló enzimet – *RsaI*, *HinfI* és a *HaeIII* - kiválasztva elvégeztük a PCR során kapott termékek restrikciós emésztését.

Az emésztés utáni kapott mintázatból (8. ábra.) látható, hogy az enzimek a szoftveres analízis során meghatározott pozíciókban emésztették a primer pár által felszaporított fragmentumokat.

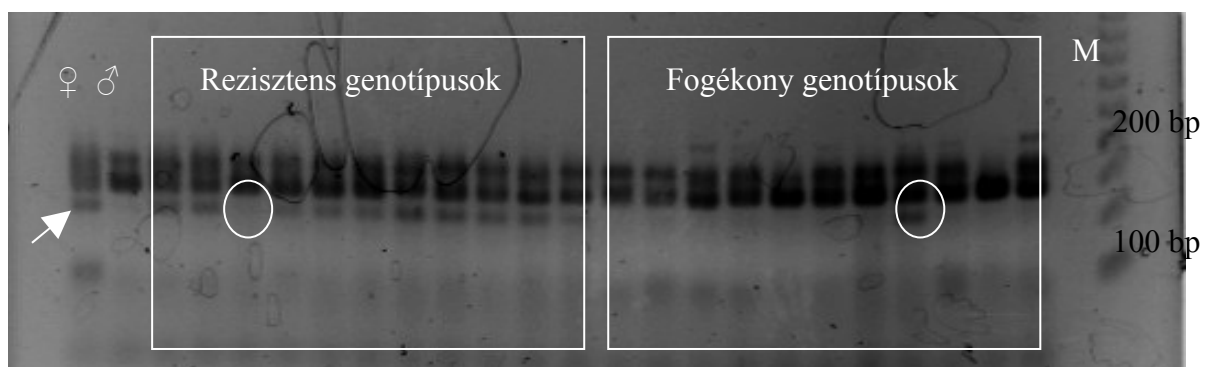


8. ábra: A restrikciós vágási helyek elhelyezkedése a *Cat-in2* fragmentumon, valamint az emésztés utáni elektroforetikus kép. WL: White Lady, M: 50 bp GeneRuler súlymarker (Fermentas, Litvania).

4.2.1.2.2. Az SSR és funkcionális markerek vizsgálatainak eredményei

A jelen kutatási programmal párhuzamosan, de a laboratóriumunktól függetlenül dolgozó két - szintén a *Ry_{sto}* gén térképezésével foglalkozó - kutatócsoport eközben a gént a XII. kromoszóma rövid karján lokalizálta (Flis et al. 2005; Song et al. 2005), ezért további - a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt - markerek detektálásához, valamint a térképi pozíció megerősítéséhez az ezekben a kapcsoltági csoportokban lokalizált PCR-alapú markereket használtunk. Mivel az RFLP technika alkalmazására laboratóriumunkban nem volt lehetőség, ezért PCR alapú, ugyanakkor referencia pontként is használható markereket kellett találnunk a gén térképhelyének meghatározásához. Az SSR markerek (Milbourne et al. 1998) valamint a Chen és munkatársai (2001) által fejlesztett funkcionális markerek használata kézenfekvő megoldásnak tűnt. Munkánk során tehát megvizsgáltuk a XI. és XII. kapcsoltági csoportokba térképezett SSR markerek (Milbourne et al. 1998) (XI: *STM0037*, *STM1009*, *STM2005*, *STM0025*; XII: *STM0003*, *STM0014*, *STM0032*, *STM0007*, *STM0040*, *STM1045*, *STM0030*, *STM2028*) és funkcionális markerek (Chen et al. 2001) (XI: *Dbe*, *Tall*, *SutI*, *ShkB*; XII: *Sus4*, *Ppe*) kapcsoltágát, egymáshoz, a térképezett markerekhez valamint a *Ry_{sto}* génhez viszonyítva.

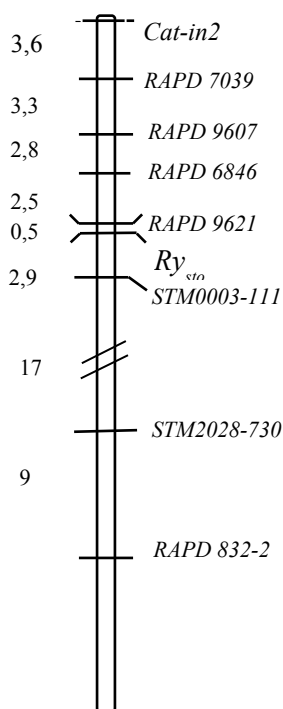
A mikroszatellit vizsgálatok során a Milbourne és munkatársai (1998) által egy kapcsoltági csoportba térképezett SSR lókuszok között nem tudtunk kapcsoltágot kimutatni. Mindössze az *STM0003* marker primer párja amplifikált egy a vártnál (141 bp) kisebb méretű (111 bp) fragmentumot, amely korrelál (2,95 cM) a génnel. A szerzők által leírt 141 bp méretű fragmentum ugyanakkor vizsgálatainkban monomorf mintázatot mutatott (9. ábra.)



9. ábra: Az *STM0003-III* SSR marker amplifikációs mintázata a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony F_1 genotípuson. A nyíl jelöli a marker fragmentumot. A karikával jelölt genotípusokban rekombinációs esemény következett be. M: 50 bp GeneRuler súlymarker (Fermentas, Litvánai).

Ezen kívül csak a XII. kromoszóma hosszú karjára térképezett *STM2028* marker (188 bp) primer párjával kapott 730 bp méretű fragmentum (*STM2028-730*) mutatott gyenge kapcsoltságot az *STM0003-111* SSR lókusszal (17 cM). Az *STM2028-730* marker proximálisan térképeződött az *STM0003-111* lókusztól (10. ábra). A Ry_{sto} gén és a négy közelebbi RAPD markerek tehát ugyanabba a kapcsoltsági csoportba, az *STM0003-111* lókusztól disztálisan lokalizálódtak (10. ábra).

A Chen és munkatársai (2001) által fejlesztett funkcionális markerek közül hat markert teszteltünk a szülőkon és a térképező populáció egyedein. Az analízis során mindössze a XI. kapcsoltsági csoportba térképezett *SutI* marker mutatott polimorfizmust a megfelelő restriktív emésztést (*RsaI*) követően. A markert az F_1 növényeken tesztelve azonban még távoli kapcsoltságot sem tudtunk kimutatni sem az SSR lókusszokkal, sem pedig a Ry_{sto} génnel.



10. ábra: A markerek és a Ry_{sto} gén térképi helye a burgonya XII. kromoszómáján. A bal oldalon feltüntetett számok a markerek közötti távolságokat jelölik cM-ban kifejezve.

4.2.2. A marker fragmentumok eredete

A Ry_{sto} génhez legközelebb térképezett négy RAPD (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*) valamint az *STM0003-111* SSR markert megvizsgáltuk a *S. stoloniferum* származékokon is, hogy információt nyerjünk a gént tartalmazó régió, és a marker szekvenciák eredetéről. A vizsgálatok során kimutattuk, hogy mindegyik származék - a

rezisztencia típustól függetlenül – tartalmazza az általunk azonosított négy a *Ry_{sto}* génhez közelebb térképezett RAPD markert. Az *STM0003-III* markert, hasonlóan a RAPD fragmentumokhoz, mind a nyolc *S. stoloniferum* származékban azonosítani tudtuk. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a gén körüli kromoszómarégió az *STM0003-III* markertől kezdve, egészen a géntől legtávolabb térképeződött *RAPD7039* markerig, mintegy 12,1 cM-os szakaszon *S. stoloniferum* eredetű.

4.2.3. RAPD markerek szekvenálása

A markerezés eredményeinek gyakorlati alkalmazása érdekében kísérletet tettünk a génhez kapcsolt RAPD markerek SCAR markerekké alakítására. Noha a RAPD fragmentumok vizsgálataink során jól ismételhetőnek mutatkoztak, az átalakítás hatékonyabb alkalmazást, és specifikusabb amplifikációt tesz lehetővé.

A négy – általunk azonosított - *Ry_{sto}* génnel kapcsolt *RAPD* marker-fragmentumot kivágtuk az agaróz gélből, majd tisztítottuk azokat. Egy újabb PCR-el a célszekvenciákat felszaporítottuk, és elektroforetikus ellenőrzést végeztünk. Mindegyik, a gélből kivágott és felszaporított fragmentum esetén csak egy terméket kaptunk, amelyek mérete minden esetben megegyezett az eredeti marker méretével. A PCR során kapott fragmentumokat klónozás nélkül, közvetlenül szekvenáltattuk.

A *RAPD6846* marker egy 518 bp méretű szakaszát sikerült megszekvenálni, amely a 46-os jelzésű primer kapcsolódási helyét is tartalmazza. A *RAPD9621* és a *RAPD9607* markerek esetén 900 bp, valamint 919 bp méretű szekvenciákat kaptunk, amelyek a detektált marker fragmentumoknak (1200 bp és 1500 bp) csak egy részét reprezentálják, így sem a primereket, sem azok kapcsolódási helyeit nem sikerült azonosítani bennük. A *RAPD7039* marker 310 bp méretű szekvenciájában a 70-es jelzésű primer kapcsolódási helye található meg. A marker fragmentumok szekvenciáit a Függelék 1.a.- d. ábrái mutatják.

4. Homológia vizsgálat

A *RAPD9621-RAPD7039* markerek közötti régió jellemzése, illetve a markerek esetleges pontosabb lokalizációja érdekében, a marker-szekvenciákkal - az elérhető nyilvános adatbázisokban - homológia keresést is végeztünk.

Három marker (*RAPD6846*, *RAPD9607*, *RAPD7039*) magas homológiát (86%-89%) mutatott *S. demissum* vad fajtából származó szekvenciákkal, illetve a *RAPD9621* és *RAPD9607* markerek *S. tuberosum* eredetű klónokkal is.

A *RAPD9621* marker 647 bp méretű szakaszon magas homológiát (86%) mutatott egy, a burgonya V. kromoszómáján elhelyezkedő *S. tuberosum* BAC klónnal (AY730339), amely egy fitoftóra rezisztencia típusú protein mRNS szekvenciájával mutatott hasonlóságot. Ugyanakkor 79%-os azonosságot mutatott a *S. lycopersicum* X. és XII. kromoszómájának centromér régiójában elhelyezkedő AC171732, valamint az AY850394 jelzésű klónokkal.

A *RAPD6846* marker több paradicsomból származó szekvenciával, valamint rövid szakaszon egy a *S. demissum* V. kromoszómáján lokalizált klónnal mutatott magas homológiát.

A *RAPD9607* fragmentum 89%-os azonosságot mutat (450bp méretű szakaszon) a *S. tuberosum* V. kromoszómáján elhelyezkedő lókusszal (AC151957), valamint egy a XII. kromoszómán elhelyezkedő, vírus és nematóda rezisztencia géneket tartalmazó rezisztencia gén klaszterrel (86%-os homológia 386bp méretű szakaszon). A marker a *S. demissum* V. kromoszómájáról származó három BAC klónnal (AC149290, AC149301, AC149266) is magas (85%-87%) hasonlóságot mutat.

A *Ry_{sto}* géntől legmesszebb térképeződött marker (*RAPD7039*) négy, a *S. demissum*-ból származó klónnal (PGEC517A09, PGEC858M02, PGEC475B22, PGEC219) valamint egy a *S. bulbocastanum* VIII. kromoszómáján elhelyezkedő, fitoftóra rezisztencia gén részét képező klónnal mutatott magas szekvencia azonosságot.

A marker-szekvenciák ugyanakkor nem mutattak - még rövid szakaszokon sem - homológiát a Song és munkatársai (2005) által meghatározott, a XII. kromoszóma *Ry_{sto}* gént tartalmazó régiójából származó klónokkal, szekvenciákkal. Egyik markerünk esetében sem találtunk a marker teljes méretére kiterjedő, a lokalizálást segítő 100%-os homológiát.

4.2.5. Markerekre alapozott szelekciós rendszer

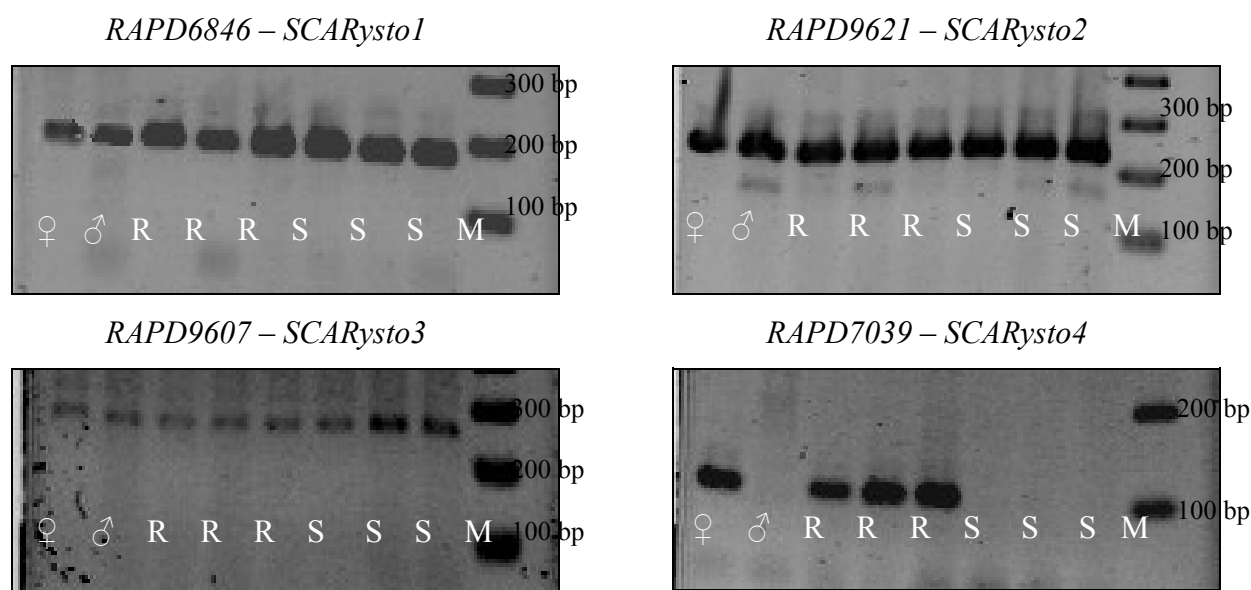
4.2.5.1. SCAR markerek tervezése

A fragmentumok bázissorrendje alapján - a *Primer3* szoftver segítségével - specifikus primereket terveztünk, amelyek szekvenciái és a PCR során várt termékek mérete a 2. táblázatban látható.

2. táblázat: A *Primer3* programmal tervezett, a marker szekvenciákra specifikus primerek szekvenciája

RAPD marker	SCAR marker	Hossz (bp)	Szekvencia	T _m (°C)	Várt termék mérete (bp)
RAPD6846	SCAR _{ysto1}	20	3'-TGCCACGAAATGGTTATTGA-5'	53.2	181
		20	3'-TAACGGAGGCTGACCAAATC-5'	57.3	
RAPD9621	SCAR _{ysto2}	20	3'-GGAGCGATCGGAATTATTGA-5'	55.3	230
		20	3'-CCTGATCAGAGGTGTGCGTA-5'	59.4	
RAPD9607	SCAR _{ysto3}	20	3'-TTTGGGCACTTAGCAACAAA-5'	53.2	250
		20	3'-AGGAGGCGGTTGGAATTACT-5'	57.3	
RAPD7039	SCAR _{ysto4}	20	3'-ATTTCGTTGCGCTCTCTCCT-5'	57.3	100
		22	3'-TCATCACCCCTAACAAATACAA-5'	54.7	

A specifikus primerpárokat első lépésben a két szülőn vizsgáltuk polimorfizmus azonosítása érdekében. Mindegyik a várt méretű terméket amplifikálta, azonban csak a *SCAR_{ysto4}* marker-szekvenciára tervezett primerek használatával kaptunk polimorfizmust a két szülő között. (11. ábra). A markert a térképező populáció egyedein is visszaellenőrizve a RAPD vizsgálatokkal megegyező eredményt kaptunk, tehát a *SCAR_{ysto4}* marker a RAPD fragmentummal azonos pozícióba térképeződött.



11. ábra: A SCAR markerek amplifikációs mintázata a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint három rezisztens (R) és három fogékony F₁ genotípuson. M: 100 bp GeneRuler súlymarker (Fermentas, Litvánia).

4.2.5.2. A markerek tesztelése különböző PVY rezisztenciájú fajtákon

A markerekre alapozott szelekciós rendszer megvalósításához első lépésként, a *SCARysto4* és az *STM0003-111* SSR markereket különböző PVY rezisztencia géneket hordozó és a vírusra fogékony magyar, holland és német fajtákon teszteltük (3. táblázat).

A vizsgálatokhoz felhasznált külföldi, illetve a Pannónia és Rachel magyar fajták PVY rezisztencia tulajdonságait irodalmi adatokból ismerjük, míg a keszthelyi nemesítésű fajtákat a fajta előállítás folyamata során elvégzett mechanikai, oltásos és utód-gumó rezisztencia vizsgálatok eredményei alapján válogattuk ki.

3. táblázat: A két marker (*SCARysto4*, *STM0003-111*) vizsgálata különböző rezisztens és fogékony burgonya fajtákon.

Fajta	Rezisztencia gén(ek)	<i>SCARysto4</i>	<i>STM0003-111</i>
Aladin	Fogékony	-	-
Bettina	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Ciklámen	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Cleopatra	Fogékony	-	-
Dura	Fogékony	-	-
Góliát	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Hópehely	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Kánkán	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Kondor	Fogékony	-	-
Kuroda	Fogékony	-	-
Lorett	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Luca XL	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Pannonia	<i>Ry_{chc}</i>	-	-
Rachel	<i>Ry_{chc}</i>	-	-
Ratte	Fogékony	-	-
Rioja	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Santé	<i>Ry_{sto}</i>	-	-
Somogyi sárga kifli	Fogékony	-	-
Stirling	Fogékony	-	-
Vénusz	<i>Ry_{sto}</i>	+	+
Viktoria	Fogékony	-	-
WhiteLady	<i>Ry_{sto}</i>	+	+

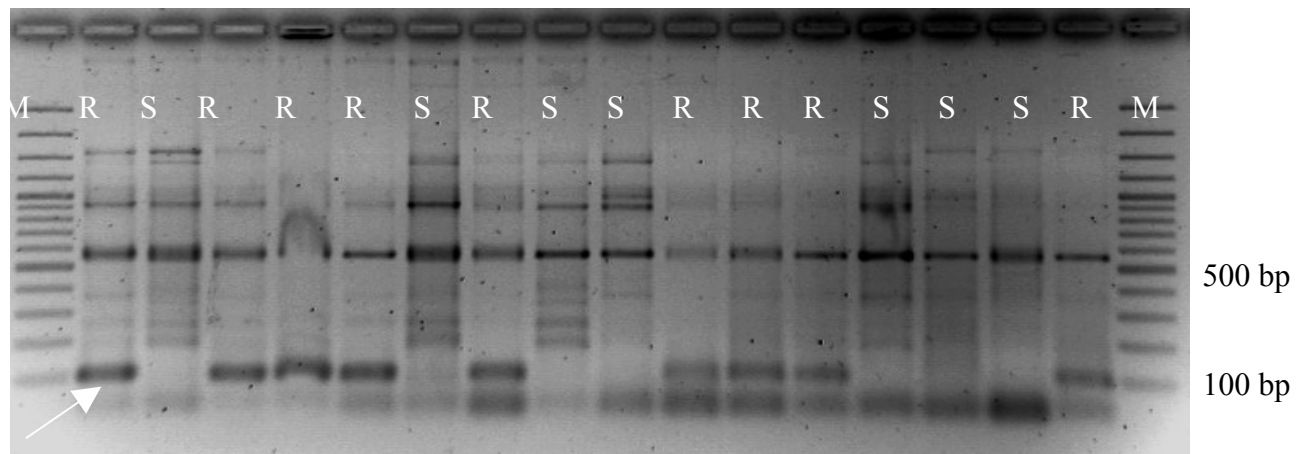
A vastag betűvel kiemelt fajtában, a marker által azonosított genotípus nem egyezett meg a rezisztencia típusal.

Ry_{sto}: *S. stoloniferum* eredetű rezisztencia gén; *Ry_{chc}*: *S. chacoense* eredetű rezisztencia gén

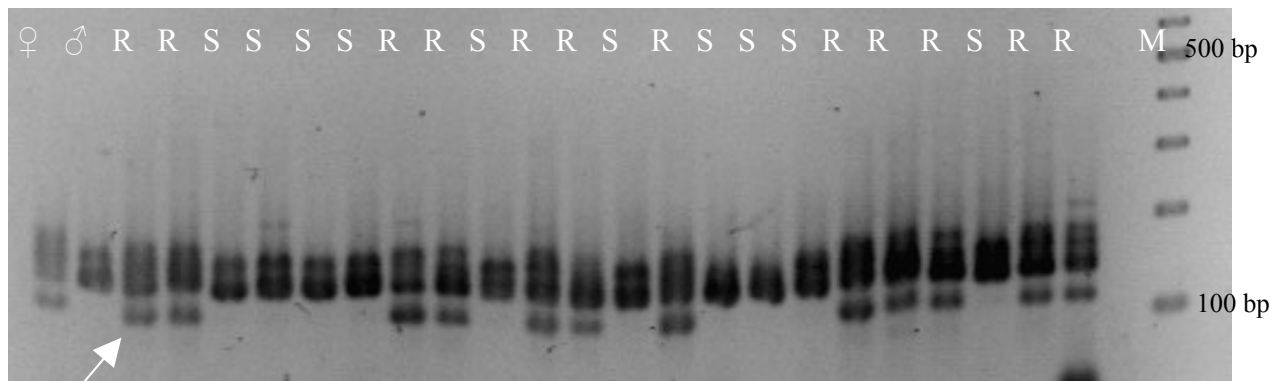
A vizsgált fajták mindegyikének tekintetében mindkét diagnosztikai markerfragmentum ugyanazt az eredményt mutatta, tehát megjelentek a *Ry_{sto}* gént tartalmazó rezisztens fajtákban, míg hiányoztak a fogékony, valamint a *Ry_{chc}* gént tartalmazó fajtákból. Egy kivételt azonosítottunk, ami a holland Santé fajta volt. Pedigréje szerint ez a fajta ugyan hordozza a *Ry_{sto}* gént, azonban a markereinket mégsem sikerült kimutatni belőle.

4.2.5.3. A markerek szelekciós alkalmazhatóságának vizsgálata a gyakorlati nemesítésben

A markerek szelekciós alkalmazásának lehetőségét tovább vizsgálva, a tesztelést kiterjesztettük további négy populáció, összesen 467 F₁ utódjára. A keresztezésekből származó F₁ genotípusok mindegyikén ellenőriztük a két *Ry_{sto}* génhez kapcsolt diagnosztikai marker-fragmentum (*SCAR_{ysto4}* 100 bp (12. ábra), *STM0003-III* 111 bp (13. ábra) jelenlétét, majd a genotipizálás során kapott eredményeket - a MAS hatékonyságának számszerűsítéséhez - a szerológiai vizsgálatok eredményeihez hasonlítottuk.



12. ábra: A *SCAR_{ysto4}* marker amplifikációs mintázata a WL x Impala keresztezésből származó rezisztens valamint fogékony F₁ egyedeken. M: 100 bp súlymarker GeneRuler (Fermentas, Litvánia), R: rezisztens genotípus, S: fogékony genotípus. A nyíl jelöli a *SCAR_{ysto4}* marker fragmentumot.



13. ábra: A *STM0003-111* marker amplifikációs mintázata a WL x Impala keresztezésből származó rezisztens valamint fogékony F_1 egyedeken. M: 100 bp GeneRuler súlymarker (Fermentas, Litvánia), R: rezisztens genotípus, S: fogékony genotípus. A nyíl jelöli az *STM0003-111* marker fragmentumot.

Az egyik szegregáló populációt a WL és S440 között végzett újabb keresztezéssel hoztuk létre. Ezt a későbbiekben - további F_1 genotípusokkal kiegészítve - a *Ry_{sto}* gén finomtérképezésére is fel szeretnénk használni. A másik három hasadó populáció (WL x S438, WL x Impala, Rioja x S440) a Burgonyakutatási Központban folyó, egy - jó chips tulajdonságokkal és PVY extrém rezisztenciával rendelkező - új burgonya fajta előállítására irányuló nemesítési program keretében végzett keresztezésekből származott.

Mind a négy keresztezésben az anyai partner hordozta a *Ry_{sto}* gént, míg a pollen donor fogékony volt a PVY-ra.

A WL és S440 keresztezésből fogott magokat elvetve, majd az egyes genotípusokat felszaporítva, 278 növényen végeztük el a molekuláris és fertőzési vizsgálatokat. A DNS izolálást követően az egyedeket leteszteltük a markerek jelenlétére, majd a marker-szelektált növényeket hagyományos fertőzési tesztekkel fenotipizáltuk. Ennek során a növényeket - négy-hat leveles állapotban - mechanikailag inokuláltuk a PVY^{NTN} törzsével, majd az inokulációt követő negyedik, ötödik és hatodik héten a növényeket DAS-ELISA-val vizsgáltuk. A szimptomatológiai vizsgálatok során a PVY fertőzésre jellemző tünetegyüttesből kizárólag lokális mozaik nekrozisokat tapasztaltunk a fertőzött fogékony növények levelein. Mindegyik, az inokuláció hatására tünetet mutató növény a DAS-ELISA vizsgálatok során is pozitív reakciót adott.

Vizsgálataink során a WL x S440 keresztezés tekintetében 127 genotípust azonosítottunk, amelyek mind a marker alapú szelekcióban, mind a DAS-ELISA során rezisztensnek mutatkoztak; míg 115 genotípust fogékosnak minősítettünk a molekuláris és fertőzési

vizsgálatok alapján is. A két marker által határolt régióban rekombinációs eseményt 36 genotípus esetében azonosítottunk. Huszonhárom genotípus esetében a két marker egymással ellentétes rezisztencia típusra engedett következtetni. További tizenhárom genotípusban ugyan a két marker azonos rezisztencia típust mutatott, azonban ez ellentétes volt a fertőzési vizsgálatokban kapott rezisztencia típussal. Ezekből tizenkettő egyik markert sem tartalmazta annak ellenére, hogy a DAS-ELISA során rezisztensnek mutatkoztak; míg a maradék egy vonalat ugyan a markerek alapján rezisztensnek genotipizáltuk, azonban a szerológia tesztek során mégis fogékonynak mutatkozott (9. táblázat).

A további három keresztezésből fogott magok száma, valamint csírázási százaléka alacsony volt. Végül a WL x S438 keresztezésből 19, míg a WL x Impala és Rioja x S440 keresztezésekből 79 illetve 91 F₁ genotípust kaptunk, amelyeken elvégeztük a markerek tesztelését és a fertőzési, valamint szerológiai vizsgálatokat.

Az F₁ genotípusok rezisztenciájának meghatározását a korábban leírtak szerint végeztük. A szimptomatológiai vizsgálatok során – a fent említett populáció vizsgálatával kapott eredményekhez hasonlóan - kizárólag lokális mozaik nektrózisokat tapasztaltunk a fertőzött fogékony növényeken. Az inokuláció hatására tünetet mutató növények pozitív reakciót adtak a DAS-ELISA vizsgálatok során is.

A három keresztezés tekintetében összesen 87 növényt azonosítottunk, amelyek mind a két diagnosztikai marker fragmentumot tartalmazták, és rezisztensnek bizonyultak a szerológiai vizsgálatok során is. A markerek jelenléte alapján negatívnak genotipizált, valamint a DAS-ELISA során is fogékonynak mutató egyedek száma 73 volt. Rekombinációs eseményeket 29 genotípusban azonosítottunk. Ezek között 18 genotípusban csak az egyik vagy a másik markert tudtuk azonosítani függetlenül a fenotípustól. Nyolc vonal esetén a markereket nem tudtuk detektálni, noha a rezisztencia vizsgálatok során rezisztensnek bizonyultak. A fennmaradó három rekombináns vonal ugyan mindkét diagnosztikai marker fragmentumra nézve pozitív volt, azonban a szerológiai vizsgálatok során fogékonynak mutatkoztak (4. táblázat).

4. táblázat: A marker alapú szelekciós, valamint a fenotipizálási vizsgálatok összesített eredményei a vizsgált négy keresztezés tekintetében

Keresztezések	Vizsgált egyedek	Rezisztens egyedek	Fogékony egyedek	Rekombináns egyedek
WL x S438	19	9	7	3
WL x Impala	79	36	32	11
Rioja x S440	91	41	34	15
WL x S440	278	127	115	36
Összesen	467	214	188	65

4.2.5.4. Publikált Ry_{sto} markerek vizsgálata

4.2.5.4.1. AFLP vizsgálatok

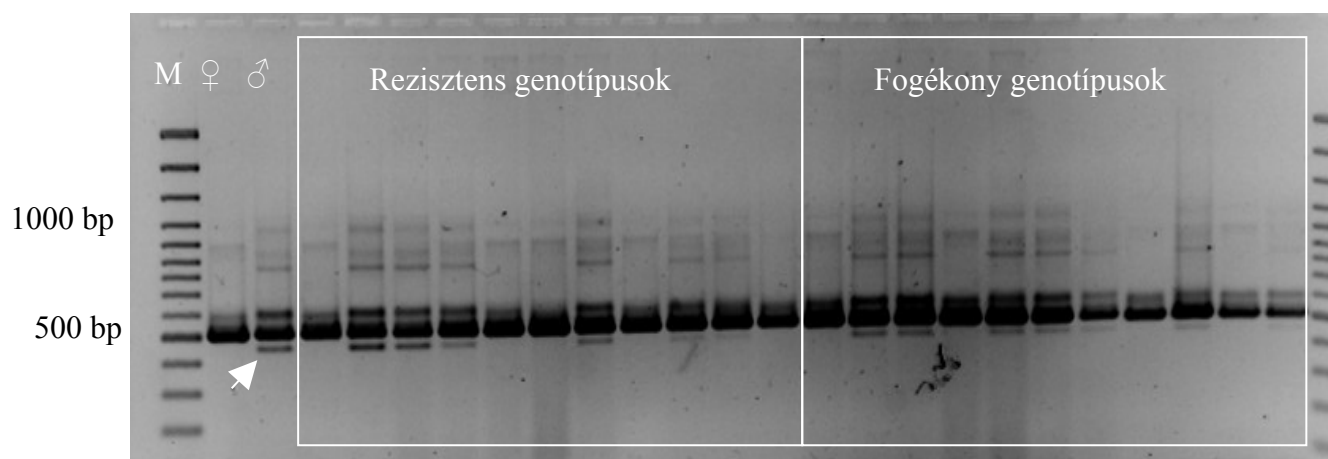
A markerek pontosabb lokalizálása, valamint a marker alapú szelekciós rendszer bővítése érdekében megvizsgáltuk a fent idézett publikációkban közölt - a Ry_{sto} génhez kapcsolt - markerek helyzetét a saját markereinkhez viszonyítva is; illetve teszteltük alkalmazhatóságukat a saját nemesítési anyagainkban.

A Brigneti és munkatársai (1997) által publikált, a génnel kapcsolt AFLP markereket ($M5$, $M6$, $M17$, $M45$) sem térképező populációnk egyedeiből készített rezisztens és fogékony két csoportban, sem a térképező populációnk két szülőpartnerében nem tudtuk azonosítani.

4.2.5.4.2. STS és CAPS markerek vizsgálata

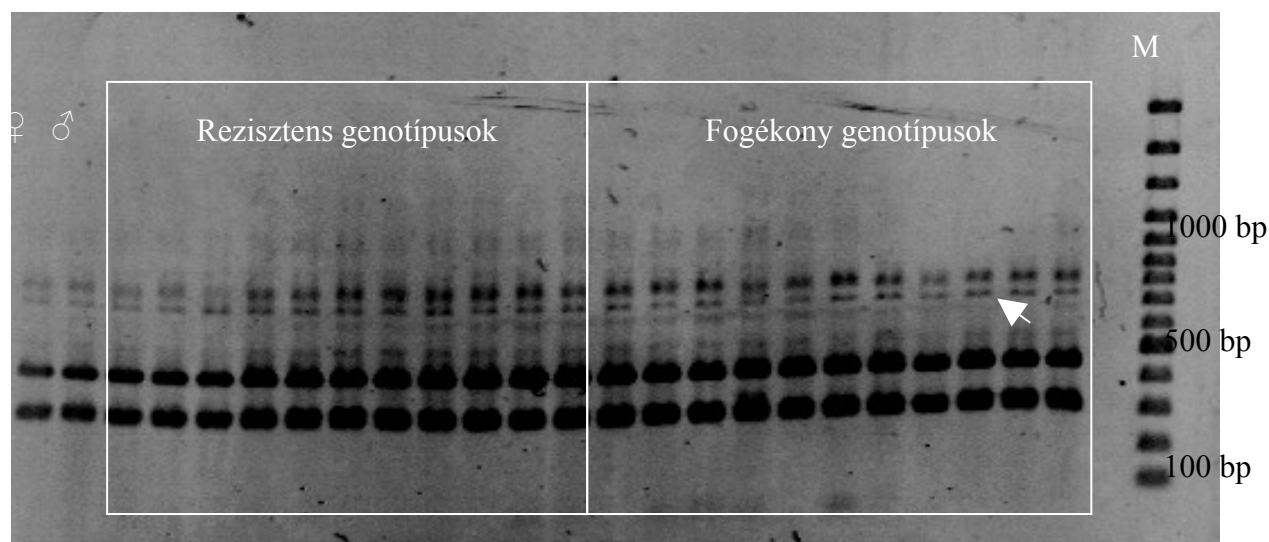
További vizsgálataink során teszteltük a Flis és munkatársai (2005) által azonosított, a XII. kromoszómára térképezett és a Ry_{sto} génnel kapcsolt 3 CAPS ($GP122$, $GP269$, $GP204$), valamint egy STS ($GP81$) markert is.

A $GP81$ STS marker esetén a vártnál (400 bp) nagyobb méretű terméket (500 bp) detektáltunk, amely monomorfnak bizonyult a szülők és az F_1 genotípusok között. A PCR során egy 450 bp méretű fragmentum is amplifikálódott, amely polimorfizmust mutatott a szülők és az egyedek között is. Ez a marker – a szoftveres analízis során – kapcsolatot mutatott a XII. kromoszómára térképezett $STM0007$ SSR lókusszal. A $GP81$ STS fragmentum szekvenciáját az adatbázisban (www.gabi.de) megvizsgálva Flis és munkatársainak (2005) ellentmondó eredményt kaptunk a marker méretének vonatkozásában. Ugyanis a fragmentumot megvizsgálva a primerek közötti szakasz nem 400 bp hanem 450 bp méretűnek mutatkozott (14. ábra).



14. ábra: A *GP81* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezsztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a polimorf fragmentumot. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).

A génhez legközelebb – attól mintegy 1,2 cM genetikai távolságra térképezett *GPI22* marker (Flis et al. 2005) vizsgálata során a restrikciós emésztést követően azonosítottuk a szerzők által leírt 718 bp méretű terméket, azonban ez monomorf mintázatot mutatott mind a szülők mind az általunk előállított térképező pouláció egyedein (15. ábra.).



15. ábra: A *GPI22* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezsztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a keresett fragmentumot. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).

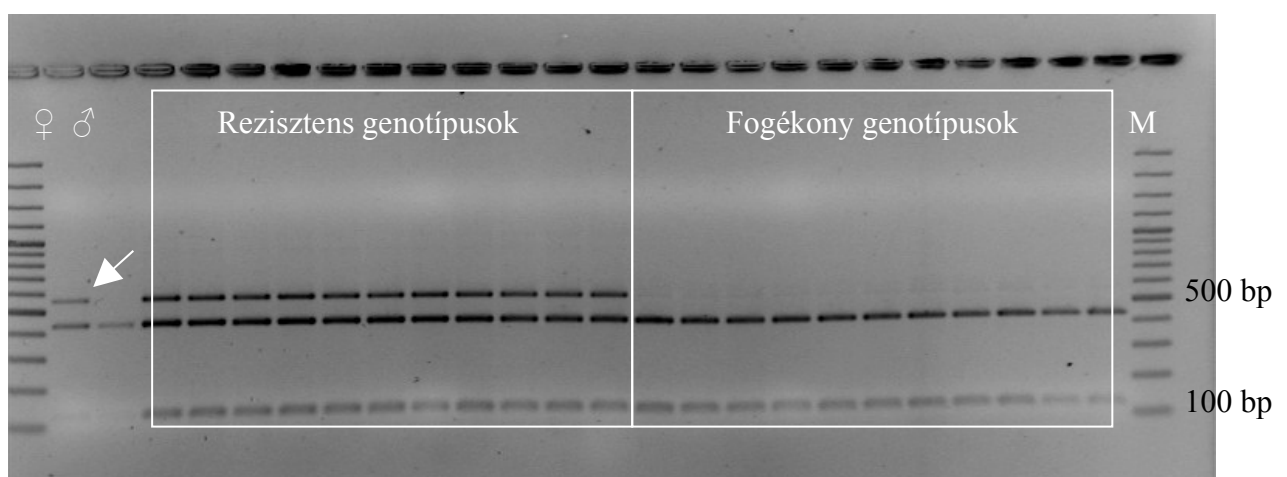
A *GP269* marker esetén is hasonló eredményt kaptunk, azaz azonosítottuk a szerzők által leírt 650 bp méretű fragmentumot, de hasonlóan a *GP122* markerhez az monomorf mintázatot mutatott az általunk előállított hasadó populációban.

A *GP204* esetén azonosított 1000bp méretű szakasz nem emésztődött el, így itt sem sikerült a várt 800bp nagyságú marker szakaszt detektálnunk.

Ezeket a markereket a nyolc vad *S. stoloniferum* származékban is leteszteltük, hogy információt nyerjünk eredetükről.

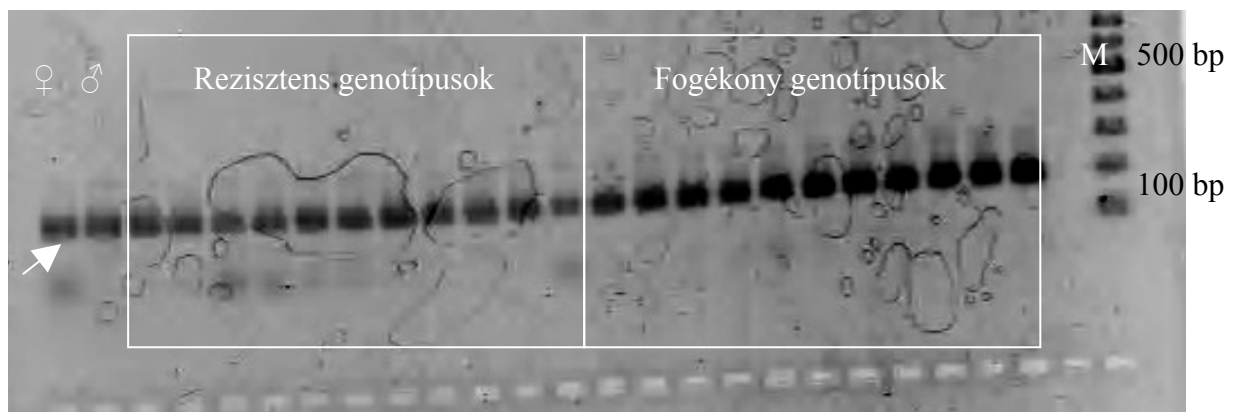
A vizsgálatok során a *GP81* STS markert nem tudtuk a származékokban azonosítani. A *GP122*, és a *GP269* CAPS markerek vizsgálata során minden esetben – hasonlóan a térképező populáció F_1 genotípusaihoz – monomorf mintázatot kaptunk a megfelelő restriktív emésztést követően. A *GP204* marker vizsgálata során a *S. stoloniferum* származékokban - egy rezisztens kivételével (No.528) - megjelent az emésztést követően a markert reprezentáló 800 bp méretű termék, melyet a térképező populációban nem tudtuk kimutatni.

A Witek és munkatársai (2006) által fejlesztett CAPS marker a *GP122₅₆₄* vizsgálata során a szerzők által közölt primer pár egy 564 bp méretű terméket amplifikált, amely az *EcoRV* restriktív emésztést követően a rezisztens genotípusokban csak részben, míg fogékony genotípusokban teljesen elemésztődött (16. ábra). A markert a hasadó populáció egyedein megvizsgálva a 4,1 cM genetikai távolságra térképeztük a *Ry_{sto}* géntől az *STM003-III* markerekkel azonos oldalra.

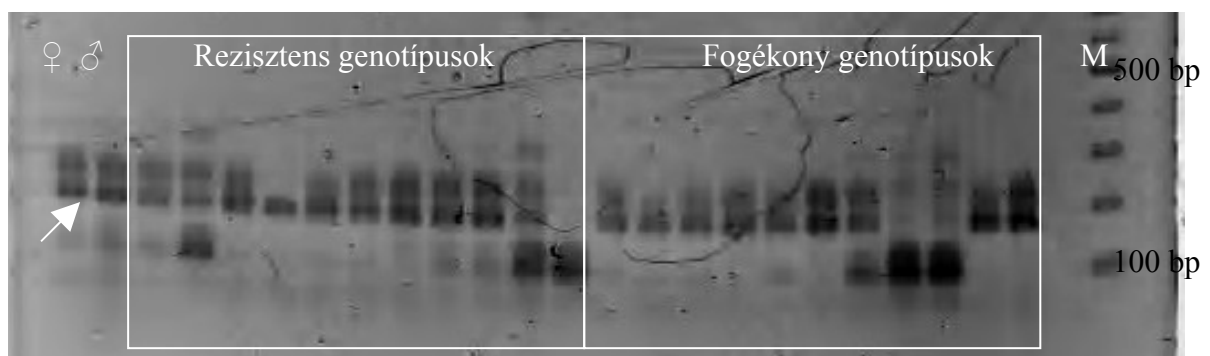


16. ábra: A *GP122₅₆₄* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a polimorf fragmentumot. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).

A Song és munkatársai (2005) - dihaploid térképezési populációt használva – 12, a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt AFLP markert detektáltak. A szerzők három, a géntől 1,8 cM-ra térképeződött AFLP marker szekvenciája alapján specifikus primer párokat is kifejlesztettek (U5-1r + U5-1f; U5-2r + U5-2f; 2-Hr + 2-Hf), amelyekből kettőt (U5-2r + U5-2f; 2-Hr + 2-Hf) sikeresen alkalmazták a rezisztens genotípusok szelekciójára (Song 2004). Ezeket a primereket az általunk használt térképezési populáció egyedein megvizsgálva ugyan azonosítani tudtuk a megfelelő méretű PCR termékeket, azonban azok monomorf mintázatot mutattak, így az általunk használt növényanyag genetikai háttérében nem használhatók rezisztencia szelekcióra (17. és 18. ábra).



17. ábra: Az *U5-2* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a keresett fragmentumot. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).



18. ábra: A *2H* marker a két szülőn (WL: ♀, S440: ♂) valamint 11 rezisztens és 11 fogékony genotípuson. A nyíl jelöli a keresett fragmentumot. M: 100 bp súlymarker (Fermentas, Litvánia).

4.2.5.5. *A Ry_{adg} specifikus SCAR marker vizsgálatának eredményei*

Brigneti és munkatársai (1997) a Ry_{sto} gént a XI. kromoszóma rövid karjára térképezték az Ry_{adg} génnel hasonló pozícióba, ezért feltételeztük, hogy a Ry_{adg} génhez fejlesztett SCAR marker (Kasai et al. 2000) kapcsolatot mutat a Ry_{sto} génnel is, így alkalmas lehet a Ry_{sto} gént hordozó genotípusok szelekciójára. A vizsgálatok során alkalmazott SCAR markert (*RYSC3* 321bp) azonban nem sikerült sem a szülőkben, sem az F_1 utódokban kimutatni. A PCR reakció során a vártnál nagyobb 400 bp méretű terméket kaptunk, amely ugyan megjelent a WL-ben és hiányzott az S440-ből, mégsem a rezisztencia fenotípusnak megfelelően hasadt. Tehát a marker nem alkalmazható sem a pozíció meghatározására, sem a Ry_{sto} gént hordozó genotípusok szelekciójára az általunk használt genetikai anyagban.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. A *Ry_{sto}* gén markerezése valamint lokalizálása a tetraploid burgonya genomban

Munkánk során létrehoztunk egy, 195 tetraploid F₁ genotíusból álló térképező populációt, a *Ry_{sto}* gént tartalmazó PVY rezisztens White Lady és a vírusra fogékony S440 vonal keresztezésével. A populáció a mendeli genetika szabályai szerint hasadt a *Ry_{sto}* génre nézve. A populáció egyedeinek rezisztencia tesztje során két jól elkülöníthető fenotípus osztályt - rezisztens és fogékony - azonosítottunk. A rezisztens és fogékony növények arányának statisztikai vizsgálata során azok szignifikánsan 1:1 hasadási arányt mutattak ($\chi^2=0,082$; $0,70 < P < 0,90$), amely arra enged következtetni, hogy a rezisztencia monogénesen kontrollált. Ugyanakkor a tetraploidok hasadásának törvényszerűségeiből következően a hasadási arány a gén szimplex állapotát is jelzi a rezisztens szülő genomjában.

A BSA során a tíz egyed DNS-ét tartalmazó csoportok használata nem tűnt hatékonynak a génhez kapcsolt markerek azonosításához. A polimorf fragmentumok ugyanis – az F₁ genotípusokon való tesztelést követően – még távoli kapcsoltságot sem mutattak a génnel. A bulkok egyedszámát 25 – 25 - re növelve a bulkok között detektált polimorf fragmentumok körülbelül 5%-a mutatott kapcsoltságot a *Ry_{sto}* génnel.

A két csoport között intenzitásbeli különbséget mutató termékeket is tovább teszteltük a térképező populáció egyedein. A fragmentumok hasadtak az F₁ szegregáló populációban, amely arra enged következtetni, hogy az adott fragmentumban meglévő intenzitásbeli különbségek is felhasználhatók adott génhez kapcsolt markerek azonosítására annak ellenére, hogy vizsgálatainkban ezek a fragmentumok nem mutattak kapcsoltságot a rezisztencia génnel. Arnedo-Andrés és munkatársai (2002) is ezzel a módszerrel azonosítottak egy a *Pvr4* génnel kapcsolt RAPD markert paprikában. A BSA során kapott eredmények jól mutatják, hogy genetikailag egymástól távol álló két szülő - mint a jelen vizsgálatban használt WL és S440 - esetén a bulk egyedszámának növelésével az azonosítható polimorfizmusok nagyobb biztonsággal kapcsolhatóak a génhez. A bulkok felbontó képessége tehát függ a szülővonalak genetikai távolságától.

A BSA során végül öt RAPD markert azonosítottunk (*RAPD9621*, *RAPD6846*, *RAPD9607*, *RAPD7039*, *RAPD832-2*) a rezisztens anyai partnerben, amelyek kapcsoltságot mutatnak a *Ry_{sto}* génnel. A *RAPD9621* markert 0,53 cM míg a *RAPD6846* és a *RAPD9607* markereket 3,03 valamint 5,84 cM genetikai távolságra térképeztünk a *Ry_{sto}* géntől. A *RAPD7039* lókuszt 9,13 cM genetikai távolságra lokalizálódott a géntől. Ez a négy marker a génnek ugyanazon oldalára térképeződött, szemben a *RAPD832-2* lókusszal, amelyet a géntől 28,94 cM

távolságra lokalizáltunk. A hasadási arányok azt mutatják, hogy mind az öt RAPD fragmentum szimplex formában van jelen a WL genomjában. A fragmentumok cisz helyzetben kapcsolnak a génnel, amely a térképező populációnk méretét figyelembe véve nem meglepő, ugyanis a négy homológ genom komponenssel rendelkező fajok esetén transz helyzetű markerek azonosítása csak extrém nagy egyedszámú hasadó populáció használatával lehetséges (Wu et al. 1992, Sorrell et al. 1992).

Mivel a polimorfizmusok előfordulása az intronokban szignifikánsan gyakoribb, mint az exonokban, így ezek kimutatása hatékony módszert nyújthat markerek azonosítására, és a gének térképi helyének meghatározására (Choi et al. 2004). A génhez kapcsolt markerek azonosításához valamint a RAPD markerek és a gén kromoszómális pozíciójának meghatározásához ezért – az intronokban rejlő polimorfizmusok kimutatására kifejlesztett - intron-targeting módszert használtuk. A vizsgálatok során a burgonya kataláz kódoló génjének (Z37106) 1504-1651 bp között elhelyezkedő 2. intronjában azonosítottunk egy hosszpolimorfizmust, amely kapcsoltságot mutat a *Ry_{sto}* génnel, tehát markerként használható. E kataláz gén kromoszómális pozíciójáról azonban nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat. Gebhardt és munkatársai (2003) ugyanakkor detektáltak egy, a burgonya XII. kromoszómáján elhelyezkedő *S2g1* markert, amely szekvencia azonosságot mutatott a burgonya e kataláz génjével. Mivel a gén a *Cat-in2* lókuszt mellett az *S2g1* markert is tartalmazza (7. ábra), ez arra enged következtetni, hogy a *Cat-in2* lókuszt és a *Ry_{sto}* gén is a XII. kromoszómán helyezkedik el. Noha az *S2g1* marker fragmentum az intron régiókat nem tartalmazza, azonban a megfelelő exon szakaszok 100%-os egyezést mutatnak a kataláz megfelelő exon szekvenciáival. Ezek az eredmények tehát egyrészt megerősítik Gebhardt és munkatársainak (2003) a kataláz gén pozíciójára vonatkozó eredményeit, másrészt alátámasztják Flis és munkatársainak (2005), valamint Song és munkatársainak (2005) a *Ry_{sto}* gén térképi helyére vonatkozó eredményeit is.

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk a primerek valóban azt a fragmentumot szaporították fel amelyekre azokat terveztük - a vágási helyek ismeretében - három enzimet (*RsaI*, *HinfI*, *HaeIII*) kiválasztva elvégeztük a PCR során kapott termékek restrikciós emésztését.

Az emésztés után kapott mintázatból látható (8. ábra), hogy az enzimek a megfelelő pozíciókban emésztették a primer pár által felszaporított fragmentumokat. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a PCR során azt a DNS szakaszt szaporítottuk fel amelyre a primer párt terveztük.

Mivel a *Cat-in2* marker egy a XII. kromoszómán elhelyezkedő gén részét reprezentálja ezért későbbi térképezési munkákban, mint referencia pont (anchor marker) felhasználható. Noha

az általunk azonosított marker természetét tekintve hasonló Chen és munkatársai (2001) által fejlesztett és térképezett funkcionális markerekhez, azonban azokkal ellentétben kimutatása sem restriktív emésztést, sem hibridizációt nem igényel. Ezek az első eredmények, amelyek az intron-targeting módszerrel azonosított markerek térképezéséről számolnak be a tetraploid burgonyában. Munkánkat folytatva reményeink szerint az első tetraploid szinten alkalmazható anchor térképet kaphatjuk.

További vizsgálataink során teszteltük más kutatócsoportok által publikált a *Ry_{sto}* génhez kapcsolt markerek helyzetét az általunk detektált markerekhez valamint a keszthelyi nemesítési alapanyagokban szereplő *Ry_{sto}* génhez viszonyítva.

A jelen kutatási programmal párhuzamosan, két - szintén a *Ry_{sto}* gén térképezésével foglalkozó - kutatócsoport a gént a XII. kromoszóma rövid karján lokalizálta (Flis et al. 2005; Song et al. 2005). Ezért megvizsgáltuk a Milbourne és munkatársai (1998) által a XI. és XII. kromoszómákra térképezett SSR markereket, valamint a Chen és munkatársai (2001) által fejlesztett, ugyanezekre a kromoszómákra térképezett funkcionális markerek helyzetét.

Az SSR analízis során mindössze az *STM0003* SSR marker primerjei által amplifikált - a vártnál kisebb méretű 111 bp – fragmentum korrelált a *Ry_{sto}* génnel. Ez megegyezik Song és munkatársainak (2005) eredményeivel, akik szintén azonosították a 111 bp méretű fragmentumot, amely vizsgálataikban együtt hasadt a *Ry_{sto}* génnel. A szerzők, mivel az *STM0003-111* markert az *STM0003* lókuszt (Milbourne et al. 1998) primerpárjaival kapták, így a 111 bp méretű markert is a XII. kromoszómára helyezték. Ezt a pozíciót az *STM0003-111* lókuszt és a XII. kromoszómára térképezett *GP81* STS marker (Flis et al. 2005) között – 57 dihaploid genotípust tartalmazó populációban - talált 34,9 cM-os kapcsoltság alapján megerősítve látták. Mindenesetre Song és munkatársai (2005) egyéb a XII. kromoszómára lokalizált markerrel nem tudtak kapcsoltságot kimutatni. Vizsgálatainkban az *STM0003-111* marker a *Ry_{sto}* géntől 2,95 cM-ra térképeződött. A Song és munkatársai (2005) által is használt a XI. és XII. kromoszómára térképezett SSR markerek nem mutattak kapcsoltságot sem a markereinkkel sem egymással. Viszont a *GP81* STS marker esetében a Flis és munkatársai által (2005) leírt 400 bp méretű fragmentum helyett az általunk detektált 450 bp méretű amplifikátum kapcsoltságot mutatott a XII. kromoszómára térképezett *STM0007* SSR lókusssal. Az STS marker szekvenciáját az adatbázisban (www.gabi.de) megvizsgálva azonosítottuk a Flis és munkatársai (2005) által leírt primereket, melyek nem 400 bp hanem 450 bp méretű szakaszt fogtak közre.

Flis és munkatársai (2005) által detektált CAPS markereket vagy nem tudtuk kimutatni, vagy monomorf mintázatot mutattak a WL és S440 szülőkből és az F₁ utódokban is. Ugyanakkor

a Witek és munkatársai (2006) által a *GPI22* marker kimutatásához fejlesztett új primer párral (*GPI22₅₆₄*) azonosítottuk a szerzők által leírt fragmentumot, amelyet az általunk előállított térképező populáción megvizsgálva 4,1 cM genetikai távolságra térképeztünk a *Ry_{sto}* géntől. Ezek az eredmények megerősítik a *Cat-in2* marker valamint az *STM0003-III* marker által meghatározott kromoszómális pozíciót.

További analízis során a XII. kapcsoltsági csoportba térképezett *STM2028* SSR marker primerpárjaival kapott – a vártnál nagyobb – fragmentum (*STM2028-730*) mutatott még gyenge kapcsoltságot az *STM0003-III* markerrel.

Meyer és munkatársai (1998) szerint az SSR markerek - mivel kodomináns viselkedésük miatt a homológ kapcsoltsági csoportok is meghatározhatók velük - kiválóan alkalmazhatók térképezésre még a tetraploid burgonyában is. Ezzel szemben munkánk során ellenkező következtetésre jutottunk. Eredményeink azt mutatják, hogy ezek a markerek nem vagy csak korlátozottan használhatók anchor markerként. Ezt támasztja alá Yamanaka és munkatársainak (2005) munkája is, amelyben a Milbourne-féle SSR markerek nagy részének új helyzetét határozták meg. A szerzők ugyanakkor beszámolnak arról is, hogy a különböző térképezési munkák eredményei - közvetlenül - más térképezési munkákban nehezen használhatóak, az alkalmazott populációk sokfélesége miatt.

Chen-féle funkcionális markerek vizsgálata során is – a vizsgált hat markerből - csak egy mutatott polimorfizmust, azonban ez sem az SSR lókuszokkal, sem a génnel nem mutatott kapcsoltságot. Ennek valószínű magyarázata, hogy a gének azonos allél variációi vannak jelen az általunk használt két szülőben.

Brigneti és munkatársai (1997) a *Ry_{sto}* gént a XI. kromoszóma hosszú karjának *GPI25* és *CT182* RFLP markerekkel határolt régiójába lokalizálták. Korábban ebbe a régióba térképezték a *S. t. ssp. andigena* eredetű PVY extrém rezisztencia gént is (*Ry_{adg}*) (Hämäläinen et al. 1997), így a *Ry_{adg}* génhez kapcsolt *RYSC3* SCAR markernek kapcsoltnak kellene lennie a *Ry_{sto}* génnel. A *RYSC3* markerek vizsgálata esetén azonban nem tudtuk a markert a térképezési populációkban azonosítani. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az *Ry_{adg}* gént a keresztezésben felhasznált egyik szülő partner sem tartalmazza.

Az eddigi irodalmi, és saját eredményeinket figyelembe véve, megállapíthatjuk, hogy a diploid térképező populációkon azonosított markerek nem, vagy csak korlátozottan alkalmazhatóak a négy homológ genom komponenssel rendelkező burgonya térképezésében. A génhez kapcsolt négy RAPD markert (*RAPD9621*, *RAPD6846*, *RAPD9607*, *RAPD7039*) PVY rezisztens és a vírusra fogékony *S. stoloniferum* származékokon tesztelve

eredményeink azt mutatják, hogy a markereket tartalmazó kromoszóma régió a *S. stoloniferum*-ból ered. Azt azonban, hogy a vizsgált származékok közül melyiket introgresszálták a nemesítés során a White Lady-be, a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet megállapítani.

Hasonló eredményt kaptunk az *STM0003-111* marker vizsgálata esetén is, tehát a géntől legtávolabb térképeződött *RAPD7039* markertől kezdve, a gén másik oldalán lokalizált *STM0003-111* markerig a Ry_{sto} gént tartalmazó kromoszómaszakasz a *S. stoloniferum* fajból ered.

A Flis és munkatársai (2005) által azonosított a Ry_{sto} génnel kapcsolt markerek esetén megállapítható, hogy ezek is - a *GP81* kivételével - *S. stoloniferum* eredetűek, azonban a fajta előállítás során nem kerültek bele a WL genomjába, ellentétben a Flis és munkatársai (2005) által használt PW-363 szülőpartnerrel.

Ugyanakkor a markerek esetén azonosított rezisztencia típustól független monomorf mintázat arra utal, hogy a fragmentumok nem kizárólag az Ry_{sto} allélhez kapcsolódnak, így jelen lehetnek a különböző *S. stoloniferum*-mal introgresszált vonalakban - a szenitívekben és a rezisztensekben egyaránt - mint ahogy az, az általunk használt térképezési populáció szülőpartnereinél is megfigyelhető.

A markerek homológia vizsgálata során azonosított szekvencia szintű hasonlóságok az V. kromoszómán lévő - számos rezisztencia gént tartalmazó - hot spot, valamint a XII. kromoszóma Ry_{sto} gént tartalmazó régiója között nagyfokú hasonlóságot jelez. Lehetséges, hogy a markereink valamilyen a rezisztencia génekre általánosan jellemző konszenzus szekvenciákat, vagy ezek egyes részeit reprezentálják. Ugyanakkor az adatok a paradicsom X. és XII. kromoszómájának centromér régiója és a burgonya Ry_{sto} gént tartalmazó régiója között is hasonlóságot jelez, így - a szinténiák következtében - esetleg az itt lokalizált markerek segítséget nyújthatnak a gén pontosabb lokalizálásában. Ezt a feltételezést támasztja alá a mindkét fajban - a XII. kromoszóma tekintetében - hasonló pozícióba térképezett nagy számú marker is (<http://www.sgn.cornell.edu/cview/>). Mivel a jelen vizsgálatban azonosított marker fragmentumok rövidek, tehát a kromoszómák csak egy töredékét fedik le, ezen hipotézisek alátámasztásához, további vizsgálatok szükségesek.

5.2. A markerek szelekciós alkalmasságának vizsgálata

Mivel a markerezés eredményei a gén térképi helyének meghatározásán kívül - gyakorlatiasabb megközelítésben - szelekciós eszközként is használhatók, ezért kísérletet tettünk egy - az általunk azonosított markerekre alapozott - szelekciós rendszer kidolgozására.

Első lépésben megkíséreltük a génhez szorosabban kapcsolt négy RAPD fragmentumot (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*) SCAR markerré konvertálni.

A RAPD markerek átalakítása során mindössze a géntől legtávolabb 9,13 cM-ra térképeződött *RAPD7039* marker szekvenciájára tervezett primer pár amplifikált, egy 100 bp méretű terméket (*SCARysto4*), amely polimorfizmust mutatott a két szülő között. A SCAR marker genetikai szempontból az eredeti RAPD fragmentummal azonos módon viselkedik, vagyis cisz helyzetben kapcsolt a génnel, és a térképi helye is a RAPD markerrel megegyező. Noha a SCAR markerek egyik előnye, hogy kodominánsként is viselkedhetnek az átalakítás során a marker domináns jellegű maradt.

Általunk a *Ry_{sto}* gén másik oldalára térképezett *STM0003-III* markert Song és munkatársai (2005) sikeresen alkalmazták 106 különböző forrásokból származó burgonyafajta fenotipizálására (Song et al. 2005). Mivel a *STM0003-III* marker agaróz gélen egyértelműen szétválasztható és könnyen értékelhető (13. ábra), ezért ezt a markert is teszteltük a szelekciós rendszer létrehozása céljából.

A két marker a *Ry_{sto}* gén két oldalán helyezkedik el, egymástól 12,08 cM genetikai távolságra. A marker alapú szelekciós rendszer kidolgozásához a markerek alkalmazhatóságát első lépésben ismert rezisztencia típusú fajtákon teszteltük. Mindkét markert azonosítani tudtuk a rezisztens fajtákban, míg a marker-fragmentumok hiányoztak a fogékony és a rezisztens, de a *Ry_{chc}* gént hordozó – Pannónia, Rachel – fajtákból is. Eredményeink azt jelzik, hogy a markerek specifikusak, azaz, csak a *Ry_{sto}* gént hordozó genotípusokban azonosíthatóak. A vizsgált fajták tekintetében egy kivételt azonosítottunk, amely a holland Santé volt. Ez a fajta, pedigreje szerint ugyan a *S. stoloniferum*-ból származó *Ry* gént hordozza, azonban egyik markerünket sem sikerült azonosítani benne. Ez a gén és a marker között történt rekombinációval, esetleg egy másik allél, vagy nem a *S. stoloniferum*-tól származó *Ry* gén jelenlétével magyarázható. Flis és munkatársai (2005) szintén nem tudták kimutatni a *Ry_{sto}* génhez legközelebb térképezett *GPI22* markerüket ebben a fajtában. A szerzők ezt szintén a fent említett indokokkal magyarázták.

A fent említett vizsgálatokban szereplő közös fajták csekély száma azonban óvatosságra int a *Ry_{sto}* gén valamint a fajtába introgresszált származék eredetére vonatkozó helyes következtetések levonását illetően. A markerezési adatokat figyelembe véve azonban valószínűsíthető, hogy a Song munkatársai (2005) valamint Flis és munkatársai (2005) és a jelen értekezésben vizsgált gén esetleg azonos. Ezen a hipotézisek megerősítéséhez - a vizsgálatok korlátozott száma és a fajták eredetére vonatkozó hiányos genetikai ismereteink miatt - további vizsgálatok elvégzését tartjuk szükségesnek.

Jelenleg több, a PVY rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markert ismerünk a burgonyában (Brigneti et al. 1997; Hämäläinen et al. 1997, 1998; Kasai et al. 2000; Hosaka et al. 2001; Celebi-Toprak et al. 2002; Flis et al. 2005; Song et al. 2005) azonban mégis kevés információ áll a rendelkezésünkre ezek gyakorlati alkalmazhatóságáról. Markereink szelekciós hatékonyságát ezért a gyakorlati nemesítésben vizsgáltuk.

A vizsgálatok során négy populáció mintegy 476 F₁ utódját teszteltük a *SCARysto4* és a *STM0003-111* diagnosztikai marker fragmentumok jelenlétére, majd a MAS eredményeit szerológiai vizsgálatokkal ellenőrizve a két vizsgálat közötti különbségeket használtuk a MAS hatékonyságának számszerűsítésére.

Az eredményeink azt mutatják, hogy a *SCARysto4* és az *STM0003-111* markerek szimultán használata nagy hatékonysággal, 99%-os biztonsággal alkalmazható a *Ry_{sto}* gént hordozó genotípusok szelekciójára.

Habár a négy keresztezés tekintetében azonosított rekombináns egyedek száma (13,9%) nagyoknak tűnik, azonban ez teljes mértékben magyarázható a két marker közötti – a térképező populáción kapott – 12,1 cM genetikai távolsággal. A marker alapú szelekció alkalmazhatósága és a megbízhatóság ugyanis függ a marker és a célgén közötti kapcsoltság fokától (Hermsen 1994, Solomon-Blackburn és Barker 2001). Noha a 2,95 cM valamint a 9,13 cM távolság nem jelez szoros kapcsoltságot, azonban más tanulmányokban, adott géntől még távolabb térképeződött markereket is sikeresen alkalmaztak különböző rezisztencia géneket hordozó burgonya genotípusok fenotipizálására (Hämäläinen et al. 1997, Kasai et al. 2000, Marczewski et al. 2001).

Negyvenegy növényben a két diagnosztikai fragmentum eltérő rezisztencia genotípust mutat. Ebből az *STM0003-111* marker 29, a *SCARysto4* marker 12 esetben mutatta a szerológiai tesztek során meghatározott genotípust. Ez nem meglepő, hiszen az *STM0003-111* marker közelebb térképeződött a génhez. Így ezekben az esetekben, a génhez közelebbi markert figyelembe véve az azonosított rekombinánsok száma közel 50%- al csökkenthető. A rekombinánsok között négy olyan fogékony egyed is azonosítottunk, melyekben a szerológiai tesztekkel ellentétben mindkét marker megjelent. Ez az összes szelektált genotípus tekintetében 0,8%-os genotipizálási hibát jelent. Ezekben az egyedekben feltételezhetően rekombináció következtében a *Ry_{sto}* gén kihaladt a markerek közül. Ezek az egyedek ugyan a téves fenotipizálás következtében kikerülhetnek a szántóföldre, azonban ott megfertőződve a szimptómák alapján könnyen azonosíthatókká válnak, így a további nemesítési folyamatból kizárhatóak. A markerek tehát lehetőséget nyújtanak a rezisztencia gént hordozó genotípusok pre-szelekciójára, így – szimplex állapotú gén esetén – elég csak a populáció felét felnevelni.

Tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amelyben a molekuláris technikákat a gyakorlatban alkalmazva PCR–alapú markerek segítségével lettek *Ry_{sto}* gént hordozó burgonya genotípusok szelektálva. Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk fejlesztett SCAR, valamint a vizsgálatokba bevont SSR marker szimultán alkalmazása hatékony lehet a gyakorlati nemesítésben.

A marker alapú szelekciónak különösen nagy jelentősége van a vírus rezisztencia nemesítés folyamatában. A markerek használatával egyszerre több gén vagy tulajdonság szimultán analízise végezhető el (Barone 2004). Mivel a molekuláris markerek alkalmasak a rezisztencianemesítés alapját képző introgressziós folyamatok nyomonkövetésére, a vad genom tartalom csökkentéséhez szükséges évekig tartó visszakeresztezés – a szelekciós rendszer megnövelt áteresztőképességének és pontosságának köszönhetően – lerövidíthető.

A marker alapú szelekciós rendszerek továbbá hasznosak lehetnek a genotipizálási vizsgálatokban, különösen ahol adott genotípusból nem áll rendelkezésre a szerológiai tesztek ismételt elvégzéséhez megfelelő növényszám, és így a hagyományos rezisztencia vizsgálatok nem végezhetőek el a megfelelő biztonsággal.

Mivel vizsgálataink során a különböző genetikai háttérben fejlesztett markerek korlátozott alkalmazhatóságát figyeltük meg, megállapíthatjuk, hogy a marker alapú szelekciós rendszerek biztonsága nagymértékben függ attól a genetikai és laboratóriumi háttértől, ahol az adott markert kifejlesztették. A szelekció hatékonyságát azonban kombinációs, több típusú markert tartalmazó rendszerek alkalmazásával, valamint a génre specifikus primerek használatával növelhetjük. Génre specifikus markerek tervezésével és használatával, a szelekció hatékonyságát 100%-ra növelhetjük, mivel a marker és a gén közötti rekombinációból adódó téves genotipizálás kiküszöbölhető. Ennek alapja a gént tartalmazó kromoszóma régió molekuláris markerekkel való telítése, amely egy, a gént tartalmazó genotípusból készített klóntár előállításával, már lehetőséget nyújt a gén izolálására, és a génre specifikus primerek tervezésére. A gödöllői MBK-val együttműködve elkészítettük a WL BAC klóntárát, melyben a *RAPD9621* markerünkből kiindulva megkezdhető a markereinket tartalmazó klónok azonosítását.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során létrehoztunk egy, 195 F₁ utódot tartalmazó szegregáló populációt, a PVY rezisztens White Lady fajta és a vírusra fogékony S440 nemesítési vonal keresztezésével. A hasadó populációt felhasználva térképeztük a *Solanum stoloniferum* eredetű PVY extrém rezisztenciát kontrolláló *Ry_{sto}* gént tartalmazó régiót. A populáció rezisztencia tesztjei során két fenotípus osztályt (rezisztens és szenzitív) különítettünk el. A vizsgálatok során kapott 95 rezisztens és 100 fogékony egyed statisztikai elemzése 1:1 hasadást mutat, amely azt jelzi, hogy a rezisztencia egy gén által kontrollált, amely szimplex állapotban van jelen a rezisztens szülőben, míg hiányzik a fogékonyból.

A molekuláris vizsgálatok során 5 RAPD markert (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*, *RAPD832-2*) azonosítottunk, melyek kapcsoltságot mutatnak a *Ry_{sto}* génnel. Ezek mindegyike - hasonlóan a *Ry_{sto}* génhez - szimplex állapotban van jelen a rezisztens szülő genomjában. Négy marker - *RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039* - a génnek azonos oldalán helyezkedik el, míg a *RAPD832-2* lókuszt azokkal szemben.

A markerek valamint a gén térkép helyének meghatározásához az általunk fejlesztett - a burgonya genetikai kutatásokban ezidáig nem alkalmazott - intron-targeting markereket valamint – más kutatócsoportok vizsgálatainak eredményeit figyelembe véve (Flis et al. 2005, Song et al. 2005, Witek et al. 2006) – a burgonya XI. és XII. kromoszómájára térképezett SSR (Milbourn et al. 1998) és funkcionális (Chen et al. 2001) markereket használtuk. Az intron-targeting analízis során azonosítottunk egy a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt markert (*Cat-in2*), amelyet a XII. kromoszómán lokalizáltunk. Ezen felül a korábban a XII. kapcsoltsági csoportba térképezett *STM0003* valamint *STM2028* SSR markerek primerjei által felszaporított, a várttól eltérő méretű markerek mutattak kapcsoltságot egymással és a génnel. Ugyanakkor a - korábban a burgonya XII. kromoszómájára térképezett - *GPI22₅₆₄* CAPS marker (Witek et al. 2006) és a *Ry_{sto}* gén között is tudtunk kapcsoltságot kimutatni.

A munkánk során létrehoztunk tehát egy új – RAPD, SSR, CAPS és intron-targeting markereket tartalmazó - genetikai térképet a burgonya genom *Ry_{sto}* gént tartalmazó régiójáról. A markerek összesen 37,9 cM genetikai távolságot fednek le.

A markereket tartalmazó kromoszóma régió jellemzése során kapott eredményeink azt mutatják, hogy a markerek *S. stoloniferum* eredetűek.

Mivel a vírus rezisztens fajták használatának a kórokozó által okozott hatalmas termésveszteség miatt nagy jelentősége van, így a nemesítési folyamatok egyik fő célja – a kiváló beltartalmi értékeken és feldolgozó ipari minőségen túl – a vírussal szemben extrém

rezisztenciát mutató fajták előállítására. Ezen tulajdonságok együttes kialakítása azonban bonyolult és időigényes nemesítési és szelekciós rendszereket igényel. Ezért megvizsgáltuk az általunk azonosított markerek szelekciós alkalmazásának lehetőségét a nemesítés folyamatában.

Ennek során első lépésben a génhez szorosabban kapcsolt négy markert megkíséreltük SCAR markerré konvertálni, majd a szelekciós rendszert az *STM0003-III* markerrel is kiegészítettük. A négy RAPD markerből azonban csak a *RAPD7039* markert sikerült átalakítani, így ezt, valamint az *STM0003-III* markert használtuk ismert rezisztencia típusú fajták szelekciójára. Eredményeink azt mutatják, hogy a markerek specifikusak, tehát csak a *Ry_{sto}* gént tartalmazó fajtákban jelennek meg.

Második lépésként egy jó chips és rezisztencia tulajdonságokkal rendelkező fajta előállítására irányuló nemesítési program keretében végzett három keresztezés, valamint a WL és S440 között végzett újabb keresztezésből származó összesen 476 F₁ utód rezisztenciáját vizsgáltuk markerekre alapozva. A genotipizálás során kapott eredményeket aztán hagyományos rezisztencia tesztekkel ellenőriztük. Eredményeink azt mutatják, hogy a két – a gén ellentétes oldalán elhelyezkedő - marker hatékonyan alkalmazható a *Ry_{sto}* gént hordozó genotípusok szelekciójára. Noha a vizsgálatban azonosított rekombinánsok aránya (13,9%) relatíve magas, ezek teljes mértékben magyarázhatóak a két marker közötti genetikai távolsággal. A rezisztens genotípusok két marker szimultán használatára alapozott szelekciója – a markerek között lévő 12,1 cM genetikai távolság ellenére – 99%-os biztonsággal elvégezhető.

Egyéb – más kutatócsoportok által publikált - a *Ry_{sto}* génhez kapcsolt markerek szelekciós alkalmazását vizsgálva azonban eredményeink azt mutatják, hogy a markerek két kivételtől eltekintve nem alkalmazhatóak a *Ry_{sto}* gén szelekciójára az általunk előállított növényanyagban. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a burgonyában a molekuláris markerek alkalmazhatósága tehát nagymértékben függ attól a genetikai háttértől, amelyben kifejlesztették őket.

Kutatásaink során azonosított markerekkel tehát a nemesítés folyamata felgyorsítható, a költségei csökkenthetőek, mivel – ha a gén szimplex állapotban van jelen az egyik szülőben - a növényeknek csak azt a felét szükséges felnevelni, amelyeket a markerek alapján rezisztensnek genotipizáltunk.

7. IRODALOM

- Adams SE, Jones RAC, Coutts RHA (1986) Expression of potato virus X resistance gene Rx in potato leaf protoplast. *J Gen Virol* 67: 1341-1346.
- Agrios GN (1997) *Plant Pathology*, London: Academic Press 4th 25–37.
- Arnedo-Andrés MS, Gil-Ortega R, Luis-Arteaga M, Hormaza JI (2002) Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Pvr4* locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor Appl Genet* 105: 1067-1074.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 211-215.
- Ballvora A, Hesselbach J, Niewöhder J, Leister D, Salamini F, Gebhardt C (1995) Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol Gen Genet* 249: 82-90.
- Ballvora A, Ercolano MR, Weiss J, Meksem K, Bormann CA, Oberhagemann P, Salamini F (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 J* 30: 361-71.
- Bamberg J, del Rio A (2005) Conservation of potato genetic resources. In: *Genetic Improvement of Solanaceous Crop. Volume I: Potato*. Razdan MK, Mattoo AK eds., Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA 1-38.
- Barker H (1997) Extreme resistance to potato virus V in clones of *Solanum tuberosum* that are also resistant to potato viruses Y and A: evidence for a locus conferring broad-spectrum resistance. *Theor Appl Genet* 95: 1258-1262.
- Barker H, Harrison BD (1984) Expression of genes for resistance to potato virus Y in potato plants and protoplasts. *Ann Appl Biol* 105: 539-545.
- Barone A, Ritter E, Schachtschabel U, Debener T, Salamini F, Gebhardt C (1990) Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Gen Genet* 224: 117-182.
- Barone A, Sebastiane A, Carputo D, Rocca DF, Frusciante L (2001) Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated gene pool. *Theor Appl Genet* 102: 900-907.
- Barone A (2004) Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *Am J Potato Res* 81: 111-117.

- Baulcombe D (1994) Novel strategies for engineering virus resistance in plants. *Curr Opin Biotechnol* 5: 117-124.
- Beczner L, Horváth J, Romhányi L, Förster H (1984) Studies on etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* 27: 339-352.
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe D (1997) High resolution and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor Appl Genet* 95: 153-162.
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe D (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-791.
- Bernatzky R, Tanksley SD (1986) Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887-898.
- Bormann CA, Rickert AM, Castillo Ruiz RA, Paal J, Lübeck J, Strahwald J, Buhr K, Gebhardt C (2004) Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 1126–1138.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Brigneti G, Garcia-Mas J, Baulcombe DC (1997) Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry^{sto}* in potato. *Theor Appl Genet* 94: 198-203.
- Bradshaw JE (1994) Potato molecular genetics In: Bradshaw JE, Mackay G eds., *Potato Genetics*, CAB International, Wallingford, UK, 71-99.
- Bradshaw JE, Hackett CA, Meyer RC, Milbourne D, McNicol JW, Philips MS, Waugh R (1998) Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) with a view to a marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 97: 202-210.
- Brunt AA (2001) Potyviruses. In: *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-potatoes*. Loebenstein G, Berger PH, Brunt AA, Lawson RH eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 77-84.
- Bryan GJ, McLean K, Bradshaw JE, De Jong WS, Phillips M, Castelli L, Waugh R (2002) Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet* 105: 68-77.

- Celebi-Toprak F, Slack SA, Jahn MM (2002) A new gene, *Ny_{tbls}*, for hypersensitivity to potato virus Y from *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* 104: 669-674.
- Celebi-Toprak F, Watanabe JA, Watanabe KN (2005) Molecular markers in identification of genotypic variation. In: Genetic Improvement of *Solanaceous* Crop. Volume I: Potato. Razdan MK, Mattoo AK eds., Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA 115-141.
- Chen X (2000) Molecular Mapping of Genes Involved in Carbohydrate Metabolism and Fluorescent AFLP-based Tagging of QTL in Tetraploid Potato. PhD Dissertation, Max-Planck-Institut Für Züchtungsforschung, Köln, Germany
- Chen X, Salamini F, Gebhardt C (2001) A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet* 102: 284–295.
- Choi HK, Kim DJ, Uhm T, Limpens E, Lim H, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *Medicago sativa*. *Genetics* 166: 1463–1502.
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34: 475-483.
- Cockerham G (1943) Potato breeding for virus resistance. *Ann Appl Biol* 30: 105-108.
- Cockerham G (1970) Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25: 309-348.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Collmer CW, Marston MF, Taylor JC, Jahn MM (2000) The *I* gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus Bean common mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1266-1270.
- Cooper és Jones (1983) Responses of plants to viruses, proposals for the use of terms. *Phytopath* 73: 127-128.
- Chrzanowska M (1987) Nowe izolaty wirusa Y zagrazajace ziemniakom w Polsce. I Nasiennictwo 5-6: 8-11.
- Davidson TMW (1980) Breeding for resistance to virus disease of the potato (*Solanum tuberosum*) at the Scottish Plant Breeding Station. In: Scottish Plant Breeding Station 59th Annual Report, Dundee UK, 100-108.

- de Bokx JA, and H Huttinga. 1981. Potato virus Y. In: Description of Plant Viruses, No. 242. Harrison BD, Murant AF eds., Commonwealth Mycological Institute, Kew and Association of Applied Biologists, Wellesbourne, Warwick, UK, 6.
- De Jong W, Forsyth A, Leister D, Gebhardt C, Baulcombe DC (1997) A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor Appl Genet* 95: 246–252.
- Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley SD (2002) Conservation of gene function in the *Solanaceae* as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics* 161: 1713-1726.
- Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Gebhardt C, Jiang J (2000) Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet* 101: 1001–1007.
- El-Kharbotly A, Leonards- Schippers C, Huigen DJ, Jacobsen E, Perieira A, Steikema WJ, Salamini F, Gebhardt C (1994) Segregation analysis and RFLP mapping of *R1* and *R3* alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progenies of dihaploid potato parents. *Mol Gen Genet* 242: 749-754.
- El-Kharbotly A, Palomino-Sánchez C, Salamini F, Jacobsen E, Gebhardt C (1996) *R6* and *R7* alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with *R3* locus on chromosome XI. *Theor Appl Genet* 92. 880-884.
- Fraser RSS (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 28: 179-200.
- Flis B, Hennig J, Strzelczyk-Żyta D, Gebhardt C, Marczewski W (2005) [The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Mol Breeding* 15: 95-101.](#)
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for- gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9: 275–96.
- Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtschabel U, Walkemeier B, Uhrig H, Salamini F (1989) RFLP analysis and linkage in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* 78: 65-75.
- Gebhardt, C, Ritter E, Barrone A, Debener T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann H, Thompson RD, Bonierbale NW, Ganai MW, Tanksley, SD, Salamini, F (1991) RFLP maps of potato and their alignment with homoeologous tomato genome. *Theor Appl Genet* 83: 49-57.

- Gebhardt C, Muginery D, Ritter E, Salamini F, Bonell E (1993) Identification of RFLP markers closely linked to *Hl* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor Appl Genet* 85: 541-544.
- Gebhardt C, Valkonen JPT (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu Rev Phytopathol* 39: 79-102.
- Gebhardt C, Walkemeier B, Henselewski H, Barakat A, Delseny M, Stüber K (2003) Comparative mapping between potato (*Solanum tuberosum*) and *Arabidopsis thaliana* reveals structurally conserved domains and ancient duplications in the potato genome. *Plant J* 34: 529–541.
- Gebhardt C, Bellin D, Henselewski H, Lehmann W, Schwarzscher J, Valkonen JPT (2006) Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112: 1458–1464.
- Gilbert J, Spillane C, Kavanagh TA, Baulcombe DC (1998) Elicitation of Rx-mediated resistance to PVX in potato does not require new RNA synthesis and may involve a latent hypersensitive response. *Molec Plant Micr Interact* 8: 833-835.
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 39: 439-446.
- Grube RC, Radwanski ER, Jahn M (2000) Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics* 155: 873-88.
- Hackett CA, Luo ZW (2003) TetraploidMap: Construction of a linkage map in autotetraploid species. *J Heredity* 94: 358-359.
- Haldane JBS (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet* 8: 299–309.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T (1982) A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci* 79: 6465-6469.
- Hämäläinen H, Watanabe KN, Valkonen JPT, Ariohara A, Plaisted RL, Pehu E, Miller L, Slack SA (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet* 94: 192-197.
- Hämäläinen H, Sorri VA, Watanabe KN, Gebhardt C, Valkonen JPT (1998) Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyvirus in potato. *Theor Appl Genet* 96: 1036-1043.
- Hämäläinen, JH (1999) Molecular mapping of potyvirus resistance genes in diploid potatoes. PhD Dissertation: Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

- Hämäläinen JH, Kekarainen T, Gebhardt C, Watanabe KN, Valkonen JP (2000) Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of Potato virus A in diploid potatoes. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 402-412.
- Haynes GH, Lu W (2005) Improvement at diploid species level. In: Genetic Improvement of *Solanaceous* Crop. Volume I: Potato. Razdan MK, Mattoo AK eds., Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA 101-114.
- Hawkes JG (1994) Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: Potato Genetics, Bradshaw JE, Mackay GR, eds., CAB International Wallingford, UK, 3-42.
- Hawkes JG (1990) The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, London 259.
- Hehl R, Faurie E, Hesselbach J, Salamini F, Whitham S, Baker B, Gebhardt C (1999) TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theor Appl Genet* 98: 379-386.
- Heldák J, Bezo M, Stefunova V, Forisekova K, Debreova K, Gallikova A (2005) Retrotransposon in genotyping and molecular characterisation of potato resistance to PVY in potato. Abstract book of 16TH Triennial Conference of the EAPR, 97-100.
- Hermesen JGT (1994) Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. In: Potato Genetics, Bradshaw JE, Mackay GR eds., CAB International, Wallingford, UK, 515-539.
- Horváth J (1966) Data on the possibilities of controlling potato virus. II: Experiments with the German method and the improved German method. *Act Agr Acad Sci Hung* 15: 381-393.
- Horváth J (1967) Separation and determination of viruses pathogenic to potatoes with special regard to potato virus Y. *Acta Phytopath Acad Sci Hung* 2: 319-360.
- Horváth S, Wolf I, Basky Zs, Koháry E (1995) Epidemical infection of potato Y *Potyvirus* (PVY) in 1993-94. In: Hungary. Proceedings of EAPR Virology Section Meeting, 26-27.
- Horváth J, Wolf I, Kadlicskó S, Pintér Cs, Lesemann DE, Weidemann HL (1991) Bogyó nekrotikus gyűrűfoltosság: egy deviáns burgonya Y vírus (potato virus Y) tünete. 37. Növényvédelmi Tudományos Napok Összefoglalók 88.
- Horváth S, Wolf I (1999) Virological problems of potato production in Hungary. Abstract of 14th Conference of European Association of Potato Research, 383-384.

- Hosaka K, Hosaka Y, Mori M, Maida T, Matsunaga H (2001) Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in tetraploid potato. *Am J Pot Res* 78: 191-196.
- Hospital F, Chevalet C, Mulsant P (1992) Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132: 1199-1210.
- Hutton EM (1951) Possible genotypes conditioning virus resistance in potato and tomato. *J Aust Inst Agric Sci* 17: 132-138.
- Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunker RK, Mao Yi-Pei, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertensive rat. *Cell* 67: 213-224.
- Jacobs JM, van Eck HJ, Arens P, Verker-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastiannssen HJM, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ (1995) A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor Appl Genet* 91: 289-300.
- Jacobs JME, Van Eck HJ, Horsman K, Arens PFP, Verkerk-Bakker B, Jacobsen E, Pereira A, Stiekema WJ (1996) Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. *Molecular Breeding* 2: 51-60.
- Jan Hinrichs, Sibylle Berger, Shaw JG (1998) A hypersensitive response-like mechanism is involved in resistance of potato plants bearing the *Ry_{sto}* gene to the potyviruses potato virus Y and tobacco etch virus. *J Gen Virology* 79: 167-176.
- Jones RAC (1990) Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyvirus in potato cultivars. *Ann Appl Biol* 117: 93-105.
- Kang BC, Yeam I, Jahn MM (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* 43: 581-621.
- Kanyuka K, Bendahmane A, Rouppe van Der Voort JNAM, van der Vossen EAG, Baulcombe DC (1999) Mapping of intra locus duplications and introgressed DNA: aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the *Rx* locus tetraploid potato. *Theor Appl Genet* 98: 679-689.
- Kasai K, Morikawa Y, Sorri VA, Valkonen JPT, Gebhard C, Watanabe KN (2000) Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome* 43: 1-8.
- Klement Z (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199:299-300.

- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172–175.
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4: 403-410.
- Kreuz L, Sedlak P, Krenek P, Vejl P, Melounova M, Zoufalá J, Domkárová J (2005) Assessment of applicability of elected potato resistance DNA markers against late blight. Abstract book of the 16TH Triennial Conference of the EAPR, 867-871.
- Kriegner A, Cervantes JC, Burg K, Mwangi ROM, Zhang D (2003) A genetic linkage map of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L) Lam.] based on AFLP markers. *Molecular Breeding* 11: 169-185.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174–181.
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat Genet* 14: 421-429.
- Le Romancer M, Kerlan C (1992) Potato tuber necrotic ringspot disease: A genetical approach of the phenomenon and studies about hypersensitive or extreme susceptible behaviour of several cultivars. Proceedings of the EAPR Meeting Virology Section, 91-95.
- Li X, Van Eck HJ, Rouppe van der Voort JNAM, Huigen DD, Stam P, Jacobsen E (1998) Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor Appl Genet* 96: 1121-1128.
- Lincoln S, Daly M, Lander E (1992) Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report, 3rd edition. Cambridge, MA.
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, Jahn MK (1999) Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics* 152: 1183–1202.
- Mackay GR (2005) Propagation by traditional breeding methods. In: Genetic Improvement of *Solanaceous* Crop. Volume I: Potato. Razdan MK, Mattoo AK eds. Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA 64-81.
- Mándy Gy (1965) A burgonya származása és őshazája. In: A burgonya. Máté I ed. Akadémiai Kiadó, Budapest 15-25.

- Marczewski W, Talarczyk A, Hennig J (2001) Development of SCAR markers linked to the *Ns* locus in potato. *Plant Breed* 120: 88–90.
- Marczewski W, Hennig J, Gebhardt C (2002) The Potato Virus S resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII. *Theor Appl Genet* 105: 564–567.
- Meksem K, Leister D, Paleman J, Zebeau M, Salamini F, Gebhardt C (1995) A high resolution map of chromosome V. based on RFLP and AFLP markers in the vicinity of the *R1* locus. *Mol Gen Genet* 249: 74-81.
- Mestre P, Brigneti G, Baulcombe DC (2000) An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the NIa proteinase from potato virus Y. *Plant J* 23: 653-661.
- Messeguer R, Genel MW, Steffens JC, Tanksley SD (1991) Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Molecular Biology* 16: 753-770.
- Meyer RC, Milbourne D, Hackett CA, Bradshaw JE, McNicol JW, Waugh R (1998) Linkage analysis in tetraploid potato and associating of markers with quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *Mol Gen Genet* 259: 150-160.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 9828-9832.
- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R (1998) Isolation characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet* 259: 233-245.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Múnoz FJ, Plaisted RL, Thurston HD (1975) Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* spp. *andigena*. *Am Potato J* 52: 107-115.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 155: 473–497.
- Niederhauser JS (1993) International cooperation and the role of the potato in feeding the world. *Am Potato J* 70: 385-403.
- Niewöhner J, Salamini F, Gebhardt C (1995) Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles *Gro1* and *H1*, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol Breed* 1: 57–78.

- Paal J, Henselewski H, Muth J, Meksem K, Menéndez CM, Salamini F, Ballvora A, Gebhardt C (2004) Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J* 38: 285–297.
- Paul E, Goto M, Tanksley SD (1994) SolGenes – a Solanaceae database. *Euphytica* 79: 181–186.
- Paran I, Michelmore RW (1993) Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85: 985-993.
- Perez F, Menendez A, Dehal P, Quiros CF (1999) Genomic structural differentiation in *Solanum*: comparative mapping of the A- and E-genomes. *Theor Appl Genet* 98: 1183-1193.
- Prevost A and Wilkins MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98: 107-112.
- Provan J, Powell W, Waugh R (1996) Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet* 86: 975-984.
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.
- Ronning CM, Stommel JR, Kowalski SP, Sanford LL, Kobayashi RS, Pineda O (1999) identification of molecular markers associated with leptine production in population of *Solanum chacoense* Bitter. *Theor Appl Genet* 98: 39-46.
- Ronning CM, Stegalkina SS, Ascenzi RA, Bougri O, Hart AL, Utterbach TR, Vanaken SE, Riedmuller SB, White JA, Cho J, Perrea GM, Lee Y, Karamycheva S, Sultana R, Tsai J, Quackenbush J, Griffiths HM, Restrepo S., Smart CD, Fry WE, van der Hoeven R, Tanksley S, Zhang P, Jin H, Yamamoto ML, Baker BJ Buell CR (2003) Comparative Analyses of Potato Expressed Sequence Tag Libraries. *Plant Physiology* 131: 419–429.
- Ross H (1958) Virusresistenzzüchtung an der Kartoffel. *Eur Potato J* 1: 1-9.
- Ross H (1986) Potato breeding-problems and perspectives. In: Brandes J, Bartels R, Völk J, Wetter C eds. *Advances in plant breeding. J Plant Breed* 13 (suppl.) Paul Parey, Berlin Germany 64-75.
- Roupe van der Voort J, Lindeman W, Folkertsma R, Hutten R, Overmars H, van der Vossen E, Bakker J (1998) A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor Appl Genet* 96: 654-661.

- Roupe van der Voort J, Janssen GJW, Overmars H, van Zandvoort PM, van Norel A, Scholten OE, Janssen R, Bakker J (1999a) Development of a PCR-based selection assay for root-knot nematode resistance (*Rmc1*) by a comparative analysis of the *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* genome. *Euphytica* 106: 187-195.
- Roupe van der Voort J, Kanyuka E, van der Vossen E, Bendahmane A, Moonijman P, Klein-Lankhorst R, Stiekeman W, Bbaulcombe D, Bakker J (1999b) Tightly physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol Plant-Microbe Interact* 12: 197-206.
- Roupe van der Voort J, van der Vossen JE, Bakker E, Overmars H, van Zandvoort PM, Hutten R, Klein-Lankhorst R, Bakker J (2000) Two additive QTLs conferring broad spectrum resistance in potato *Globoder pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 10: 1122-1130.
- Russell GE (1978) Plant Breeding for Pest and Diseases Resistance. Butterworths, London-Boston 231-264.
- Sato M, Nishikawa K, Komura K, Hosaka K (2006) Potato virus Y resistance gene, *Ry_{chc}*, mapped to the distal end of potato chromosome 9. *Euphytica* 149: 367-372.
- Sebastiano A, L Frusciante, Baronc A (1999) Genetic relationship among *Solanum* genotypes used to introgress the wild *S. commersonii* genome into the tuberosum gene pool. *J Genet Breed* 53: 121-126.
- Singer F, Couljon AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. I. *Mel. Biol* 94: 441-448.
- Smith KM (1931) On the composite nature of certain potato virus diseases, of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 109: 251-267.
- Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001) A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity* 86: 8-16.
- Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001) Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86: 17-35.
- Solomon RH (1978) Methods of screening for resistance to potato viruses X and Y. Abstract book of the 7th Triennial Conference of the EAPR, 159-160.

- Song YS (2004) Genetic marker analysis in potato for extreme resistance (*Ry_{sto}*) to PVY and for chip quality after long term storage at 4°C. PhD Dissertation: University of Technology, München, Germany
- Song Y, Hepting L, Schweizer G, Hartl L, Wenzel G, Schwarzfischer A (2005) Mapping of extreme resistance to PVY (*Ry_{sto}*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor Appl Genet* 11: 879-887.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Stelzner G, Lehmann H (1940) Kartoffel. In: *Handbuch der Pflanzenzüchtung*. Roemer Rudolf eds., Parey, Berlin, 96-175.
- Sorrells ME (1992) Development and application of RFLPs in polyploids. *Crop Science* 32: 1086–1091.
- Sorri VA, Watanabe KN, Valkonen JPT (1999) Predicted kinase3a motif of a resistance gene-like fragment as a unique marker for PVY resistance. *Theor Appl Genet* 99: 164-170.
- Swieżyński KM (1994) Inheritance of Resistance to Viruses. In: *Potato Genetics*, Bradshaw JE, Mackay GR, eds., CAB International, Wallingford, UK, 339-364.
- Tan A, Hutten RCB, Visser RGF, Van Eck HJ (2005) Development of marker assisted selection for potato breeding. Abstract book of the 16TH Triennial Conference of the EAPR, 660-662.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, De Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tautz D, Ranz M (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl Acids Res* 12: 4127–4138.
- Thieme R, Thieme T (2005) Resistance to viruses. In: *Genetic Improvement of Solanaceous Crop*. Volume I: Potato. Razdan MK, Mattoo AK eds. Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA 293-337.
- Valkonen JPT (1994) Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.). *Plant Breed* 112: 1-16.
- Valkonen JPT, Slack SA, Plaisted RL, Watanabe KN (1994) Extreme resistance is epistatic to hypersensitive resistance to potato virus Y^o in a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*-derived potato genotype. *Plant Dis* 78: 1177-1180.

- Valkonen JP, Jones RAC, Slack SA, Watanabe KN (1996) Resistance specificities to viruses in potato: standardization of nomenclature. *Plant Breed* 115: 433–438.
- van Eck HJ, Rouppe van der Voort J, Draaistra J, Van Zandvoort P, Van Enckevort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J (1995) The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a noninbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1: 397-410.
- van den Heuvel JFJM, van der Vlugt RAA, Verbeek M, de Haan PT, Huttinga H (1994) Characteristics of a resistance-breaking isolate of potato virus Y causing tuber necrotic disease. *Eur J Plant Pathol* 100: 347–356.
- van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G, Tanksley SD (2002) Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* 12: 1441-1456.
- Van Ooijen JW, Voorrips RE (2001) JoinMap® Version 3.0, Software for the calculation of genetic linkage map. Plant Research International Wageningen, The Netherlands.
- Vidal S, Cabrera H, Andersson RA, Fredrikson A, Valkonen JPT (2002) Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 717-727.
- Vos P, Hougens R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Walbot V, Warren C (1988) Regulation of *Mu* element copy number in maize line with an active or inactive mutator transposable element system. *Mol Gen Genet* 211: 27–34.
- Ward HM (1902) On the relations between host and parasite in the *Bromus* and their rust *Puccinia dispersa* (ERIKSS.). *Ann Bot* 16: 233-315.
- Watanabe KN (1994) Potato molecular genetics In: *Potato Genetics*, Bradshaw JE, Mackay G eds., CAB International, Wallingford, UK, 213-238.
- Watanabe KN, Golmirzaie AM, Gregory P (1997) Use of biotechnology tools in potato genetic resources management and breeding. In: Watanabe KN, Pehu E eds., *Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity*. R.G. Landes Company, Austin Tx., USA 143-154.
- Watanabe KN, Ortiz R, Watanabe JA (2005) Breeding potential and transmission of traits in 4x-2x crosses. In: *Genetic Improvement of Solanaceous Crop*. Volume I: Potato. Razdan MK, Mattoo AK eds., Science Publisher Inc., Enfield, NH, USA 83-100.

- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res* 18: 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res* 18: 6531-6535.
- Witek K, Danuta Strzelczyk-Zyta D, Hennig J, Marczewski W (2006) A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles *Ry-f_{sto}* and *Ns*. *Mol Breeding* 18: 273–275.
- Wolf I, Horváth S, Kuroli G (1996) Levéltetűvel terjedő burgonyapatogén vírusok elleni védekezés lehetőségei és a járványok kialakulásának feltételei. *Agrofórum* 7: 49-51.
- Wolf I, Horváth S (2000) A burgonya Y-vírus (potato Y potyvirus, PVY) törzseinek előfordulása burgonya-termőterületeken Magyarországon. *Növényvédelem* 36: 449-455.
- Wolf I (2001) A burgonya vírusbetegségei. *Agronapló* 6
- Wolf I (2006) A burgonyatermesztés néhány aktuális növényvédelmi kérdése. *Agrárágazat* 2006. november.
- Wricke G, Weber WE (1986) *Quantitative Genetics and Selection in Plant Breeding*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Wu KK, Burnquist W, Sorrells ME, Tew TL, Moore PH, Tanksley SD (1992) The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor Appl Genet* 83: 294–300.
- Zhang Q, Gao YJ, Yang SH, Ragub R, Saghai-Maroo MA, Li ZB (1994) A diallele analysis of heterosis in elite hybrid rice based on RFLPs and microsatellites. *Theor Appl Genet* 89: 185-192.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genom fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Yamanaka S, Ikeda S, Imai A, Luan Y, Watanabe JA (2005) Construction of integrated genetic map between various existing DNA markers and newly developed P450-related PBA marker in diploid potato (*Solanum tuberosum*). *Breeding Science* 55: 223-230.
- Yu YG, Saghai-Maroo MA, Buss GR, Maughan PJ, Tolin SA (1994) RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. *Phytopathology* 84: 60-64.

8. TÉZIS PONTOK

8.1. Tézispontok magyarul

a. A burgonya legveszélyesebb kórokozójával a burgonya Y vírussal (PVY) szemben teljes védettséget biztosító Ry_{sto} gént tartalmazó kromoszóma régiót molekulárisan jellemeztük.

A gén mindkét oldalán molekuláris markereket detektáltunk. Az általunk azonosított öt RAPD (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*, *RAPD832-2*) markerből, az első négy a génnel szorosan kapcsolt. A génhez közelebb térképeződött markerekből a *RAPD7039*-et sikeresen SCAR markerré alakítottunk.

b. Meghatároztunk két SSR markert (*STM0003-III*, *STM2028-730*), melyek kapcsoltságot mutatnak a Ry_{sto} génnel, azonban eltérő méretűek a szakirodalomban közölt (Milbourne et al. 1998) ismert pozíciójú megfelelő markerektől. Annak eldöntése azonban, hogy ezek allélok vagy külön lókuszek-e, további vizsgálatokat igényel.

c. Kimutattuk, hogy az irodalomban közölt Ry_{sto} specifikus markerek nem minden genetikai háttérben - így az általunk használt keresztezésekben sem - működnek. A vizsgált több mint 20 publikált marker közül mindössze az *STM0003-III* valamint a *GPI22₅₆₄* markerek mutattak kapcsoltságot a Ry_{sto} génnel. A tudományos eredmény a marker alapú szelekció (MAS) szempontjából nagy gyakorlati jelentőséggel bír, mivel rávilágít arra, hogy a burgonya esetében a markerek alkalmazhatósága a genetikai háttértől függ.

d. Az általunk detektált, a géntől 0,53 cM-ra térképezett *RAPD9621* marker jó kiindulási alapot képezhet a Ry_{sto} gén izolálásához. E munkához a szükséges BAC klóntárat a White Lady -ből elkészítettük.

e. A gén két oldalán elhelyezkedő (*STM0003-III*, *SCAR_{ysto4}*) markerre alapozva szelekciós tesztet végeztünk, mely a két marker között található 12,1 cM távolság ellenére 99%-os biztonsággal tette lehetővé a rezisztens genotípusra való szelekciót. Ezzel bizonyítottuk, hogy a MAS egy adott gént közrefogó markerekre alapozva - a viszonylag nagy genetikai távolság ellenére is – hatékonyan alkalmazható a burgonya gyakorlati nemesítésében.

f. Az intron-targeting módszert elsőként alkalmazva a burgonya genetikai kutatásokban, azonosítottunk egy markert, amely kapcsoltságot mutat a *Ry_{sto}* génnel. Mivel a marker fragmentum a burgonya kataláz génjének (génbanki szám: Z37106) 2. intronját reprezentálja a *Cat-in2* nevet kapta. A marker szekvencia átfedést mutat a korábban a burgonya XII. kromoszómájára térképezett *S2g1* markerrel, ezért hasonlóan ahhoz, szintén a XII. kromoszómán lokalizálódik. A *Cat-in2* marker referencia pontként (anchor marker) is használható a további térképezési vizsgálatokban.

8.2. Thesis statement

a. The chromosome region carrying the *Ry_{sto}* gene was characterized at molecular level. This gene provides an extreme resistance against the Potato Y potyvirus (PVY) that causes the greatest damage in potato production. Molecular markers were detected on both sides of the *Ry_{sto}* gene. Out of the five RAPD markers (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*, *RAPD832-2*) detected, four of them (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*) proved to be tightly linked to the target gene. One of the RAPD markers (*RAPD7039*) was converted to SCAR marker (*SCARy_{sto4}*).

b. Two SSR markers (*STM0003-III*, *STM2028-730*) linked to the *Ry_{sto}* were detected. The size of the markers were different from the corresponding markers with known map positions previously reported in the literature (Milbourne et al. 1998). Further examinations are needed to determine whether these markers represent new alleles or loci.

c. We have demonstrated that the *Ry_{sto}* gene-specific markers can not be used for selection in all genetic backgrounds. Out of more than 20 published markers tested two (*STM0003-III*, *GPI22₅₆₄*) showed linkage to the *Ry_{sto}* gene. This result is of a great importance for marker assisted selection (MAS), as it demonstrates that the applicability of the markers depends on the genetic background.

d. The *RAPD9621* marker mapped at 0,53 cM from the *Ry_{sto}* gene may be used as starters for the map-based cloning of the gene. The BAC library necessary for cloning is available.

e. Selection tests were performed based on the markers (*STM0003-III*, *SCARy_{sto4}*) localised on the two sides of the gene. The effectiveness of the selection for the resistant genotypes was 99%, in spite of the 12,1 cM genetic distance detected between the two markers. This result demonstrates that applying MAS to a target gene flanked by two markers can be applied efficiently in the practice of potato breeding.

f. A marker linked to the *Ry_{sto}* gene was identified by using at first the intron-targeting method in potato. The marker was named labelled as *Cat-in2* because it represents the second intron of the potato catalase gene (Z37106). The sequence of the marker *Cat-in2* overlaps with the

S2g1 marker localised on potato chromosome XII. The marker can be used as reference marker or anchor in the further research programs.

9. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK, ELŐADÁSOK

Referált szakfolyóiratban megjelent közlemények

- Taller J, Gulyás G, **Cernák I**, Polgár Z, Alföldi Z, Allaga J, Horváth S (2001) Using AFLP analysis for variety discrimination in potato. *Georgikon for Agriculture*. 1: 43-49.
- Cernák I**, Taller J, Wolf I, Fehér E, Babinszky G, Alföldi Z, Csanádi G, Polgár Z (2008) Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene *Ry_{sto}*, and the identification of new markers. *Acta Biologica Hungarica*, 59 (2): 195-203.
- Cernák I**, Decsi K, Nagy S, Wolf I, Polgár Z, Gulyás G, Hirata Y, Taller J (2008) Development of a locus-specific marker and localisation of the *Ry_{sto}* gene based on linkage to a catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome. *Breeding Science* (megjelenés alatt)
- Cernák I**, Decsi K, Vaszi Z, Wolf I, Polgár Z, Taller J (2008) PCR-alapú markerek alkalmazása a PVY extrém rezisztenciagént hordozó burgonya genotípusok szelekciójára. *Növénytermelés* (megjelenés alatt)

Konferencia összefoglalók

- Taller J, Gulyás G, **Cernák I**, Polgár Zs, Alföldi Z, Allaga J, Horváth S (2001) Fajtaösszehasonlító vizsgálatok AFLP technikával a burgonyában. VII. Növénytermelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 138.
- Cernák I**, Fehér E, Polgár Zs, Wolf I, Alföldi Z, Taller J (2003) Molekuláris genetikai összehasonlító vizsgálatok a burgonyában. IX. Növénytermelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 61.
- Cernák I**, Fehér E, Wolf I, Polgár Zs, Alföldi Z, Taller J (2003) PVY rezisztenciagén markerezése a burgonyában. IX. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely. CD kiadvány: 301. sz.
- Cernák I**, Fehér E, Polgár Z, Wolf I, Horváth S, Taller J (2003) Molecular genetic comparison of different potato lines. EARP-EUCARPIA Breeding and Adaptation of Potatoes, Oulu, Finland, Abstract: 33.
- Fehér E, **Cernák I**, Wolf I, Polgár Z, Taller J (2003) Molecular markers for the *Ry_{sto}* gene in potato. EARP-EUCARPIA Breeding and Adaptation of Potatoes, Oulu, Finland, Abstract: 37.

- Cernák I**, Fehér E, Babinszky G, Wolf I, Polgár Zs, Alföldi Z, Taller J (2005) Molekuláris rezisztencianemesítés a Georgikonban II. Az *Ry_{sto}* lókuszhoz kapcsolt RAPD markerek detektálása a burgonyában. XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 50.
- Taller J, **Cernák I**, Fehér E, Wolf I, Alföldi Z, Polgár Zs (2005) Molekuláris rezisztencianemesítés a Georgikonban I. PVY rezisztencia markerek a burgonyában. XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 21.
- Cernák I**, Fehér E, Babinszky G, Wolf I, Polgár Zs, Alföldi Z, Taller J (2005) Egy *Solanum stoloniferum* eredetű immunitás gén molekuláris markerezése a burgonyában VI. RODOSZ tudományos konferencia, Kolozsvár, Összefoglalók: 30.
- Cernák I**, Fehér E, Babinszky G, Wolf I, Polgár Zs, Alföldi Z, Taller J (2005) Development of RAPD markers linked to a new *Ry_{sto}* locus in potato. 16th EAPR Conference Bilbao, Spain, Abstract: 470.
- Alföldi Z, **Cernák I**, Taller J, Decsi K, Wolf I, Polgár Zs (2006) A PVY^{NTN} rezisztencia molekuláris vizsgálata vad burgonya fajokban. Abstract. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 73.
- Taller J, **Cernák I**, Wolf I, Polgár Zs. (2006) Restricted applicability of molecular markers in potato breeding. ABIC Conference, Melbourne, Australia, CD Abstract.
- Cernák I**, Decsi K, Taller J, Vaszily Zs, Wolf I, Polgár Zs (2007) A *Ry_{sto}* génhez kapcsolt markerek alkalmazhatóságának vizsgálata a rezisztencia-nemesítési programokban. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 85.
- Taller J, Alföldi Z, **Cernák I**, Decsi K, Wolf I, Polgár Zs (2007) A PVY^{NTN} rezisztencia vizsgálata cDNS szubsztrakciós módszerrel vad burgonya fajokban. XIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 68.
- Decsi K, **Cernák I**, Nagy S, Taller J, Wolf I, Polgár Zs (2008) Burgonya kapcsoltsági térkép szerkesztése, és egy termesztőközeg által kiváltott hiperszenzitiv válasszal kapcsolatba hozható QTL markerezése. XIV. Növénynevelési Tudományos Napok, Összefoglalók: 60.
- Cernák I**, Decsi K, Nagy S, Polgár Zs, Wolf I, Taller J (2008) Advancements in the application of molecular techniques at Potato Research Centre, Keszthely, Hungary. 17th EAPR Conference Brasov, Romania, Abstract: 389-391.

Az értekezés témakörében megtartott előadások

Cernák I, Fehér E, Taller J, Wolf I, Polgár Zs, Alföldi Z (2003) "Genetikai műhelyek

Magyarországon" Burgonya Y-vírus rezisztencia, valamint fajta-összehasonlító vizsgálatok molekuláris genetikai módszerekkel a burgonyában. Szeged, MTA SZBK 2003. szeptember 5.

Cernák I, Fehér E, Taller J, Wolf I, Polgár Zs, Alföldi Z (2004) "Genetikai műhelyek Magyarországon" *Solanum stoloniferum* eredetű PVY immunitás gén (*Ry*) markerezéses vizsgálata. Szeged, MTA SZBK 2004. szeptember 3.

Cernák I, Fehér E, Babinszky G, Wolf I, Pogár Zs, Alföldi Z, Taller J (2006) PVY extrém rezisztencia gén markerezése valamint publikált markerek használhatóságának tesztelése a burgonyában. Molekuláris markerek felhasználása a növénygenetikai és nemesítési kutatásokban. Martonvásár, 2006. január. 19.

Egyéb nem az értekezés témakörében megjelent publikációk

Taller J, **Cernák I**, Alföldi Z (2001) Molekuláris eszközök alkalmazása egy hiperváltozókony paprika vonal vizsgálatában. VII. Növénynemesítési Tudományos Napok, Összefoglalók: 137.

Fehér E, **Cernák I**, Alföldi Z, Taller J (2003) A paprikában *Xanthomonas campestris* fertőzésre kifejeződő génekkel homológ szekvenciák a paprikából és a burgonyából. V. Magyar Genetikai Kongresszus. Összefoglalók.

Fehér E, **Cernák I**, Alföldi Z, Kovács J, Taller J (2003) Genetikai vizsgálatok egy interspecifikus (*C. frutescens* × *C. annuum*) paprika populációban. IX. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely. CD kiadvány: 403. sz.

Müller T, Taller J, Nyitrai G, Kucska B, **Cernák I**, Bercsényi M (2004) Hybrid of pikeperch, *Sander lucioperca* L. and Volga perch, *S. volgense* (Gmelin). Aquaculture Research, 35: 915-916.

Tóth HL, Taller J, **Cernák I**, Fehér E, Kocsis L (2005) The test of Hungarian grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) by RAPD analysis. 3rd International Phylloxera Symposium. Fermantle, Australia. 7th October 2005.

Tóth HL, Taller J, **Cernák I**, Fehér E, Kocsis L (2005) A szőlőgyökértetű (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) DNS-szintű elemzése RAPD módszerrel. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, 2005. október. 19-21, Budapest

Cseh A, Varga Zs, Taller J, **Cernák I**, Fischl G (2006) Előzetes eredmények keszthelyi térségi fehér fagyöngy (*Viscum album* L.) populációk genetikai vizsgálatáról. XVI. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum. 2006. január. 27.

10. FÜGGELÉK

1. táblázat: A RAPD vizsgálatok során alkalmazott 12mer primerek szekvenciái

Primer kódja	Szekvencia 5'-3'	Primer kódja	Szekvencia 5'-3'	Primer kódja	Szekvencia 5'-3'
1	GGCATGACCTGT	34	TGGGAGATGGCT	67	CATACGGGCTAC
2	ACGATGAGCCTG	35	GGCTTATGCCGT	68	ACACTGGCTGCA
3	AATGCCGCAGCC	36	GGGACGATGGTG	69	CCATCCGTTGAA
4	GGATGCCACTGG	37	CCAGCTTAGGAC	70	CATCACCCCTAA
5	AGATGCAGCCAG	38	CCCCGGTAACTC	71	TCCGCATACCGT
6	ACATGCCGTGAC	39	GGCTAACCGATG	72	TCATTGCCCCGG
7	GGATGAGACCGG	40	GGGTAACGCCGA	73	TCTGCCATCCGT
8	AATGCGGGAGTC	41	GGACCCTTACTG	74	GGCTAGGTGGTA
9	CTATGCCGACAC	42	GTGCCTAACCGT	75	AGTGTAGCCAG
10	CTGATGCGTGTC	43	CCATCGGAGGTC	76	CATAGAGCGGAC
11	AGATGGGCAGAC	44	CCGTCCATCCAC	77	CCCCTAGACTC
12	GGGATGACCAGG	45	GTAAGGCGCATG	78	GGGCTAGTCATA
13	GAATGCGACCAA	46	GGAGTAACGGAG	79	GTCGTAGCGGAT
14	GATGGCAGTCAG	47	CCATTCCGAGTC	80	CCTACACGGTCT
15	AGATGCGCGGTA	48	CATACCTGCCAC	81	CTACGGCTTCGC
16	GAATGGCACCTG	49	GGCGCGTTAGAG	82	CCCTACGGAGAC
17	ACCGATGCTGAC	50	CCGTTAGCGTGC	83	CTACAGCGAGGC
18	CTGTGATGCCGA	51	TCTTAGGCGGCT	84	TGAGGCGTGTAG
19	GATGCCATGGAG	52	AGGCATCGTGAG	85	TGCCGTGAGACC
20	TGATGCCGCTGC	53	CCGCTCGTAAGA	86	CTGAACCGCTGT
21	TGATGGCGTCTT	54	TCATTCGCCCAG	87	GTGACCGAGTCG
22	GATGCGACGGTA	55	TCCGCATACCAG	88	ACGGACGTCACC
23	GTGAATGCGGAG	56	CATCACCCCTAC	89	CCTGCTCATCGA
24	CCAGATGGGGTC	57	GGGTGCGCATCTA	90	TCACCAGCCAGG
25	TGCCATGCTGTG	58	CCATCCGTTGTC	91	GTCAGTGCGGCA
26	TGCGATGCGAAC	59	CCCCCGTTAGAA	92	AGTCACTCCAG
27	CTGCAATGGGAC	60	CCGTTAGTCCGC	93	CTCGTAGACTGCGTACC
28	CCCATGTGTGAA	61	CATACGGGCTGC	94	AATTGGTACGCAGTCTAC
29	CCATGCGGAGTC	62	CACCATCGTGCC	95	CTCCTAGACGCGAATTCCC-
30	GGCGTATGGTAG	63	GTAAGCCGAGAG		-TCGTAGACTGCGTACC
31	CTACGATGCCGT	64	CTCCTTACGGGAC	96	GGAATTCGCGTCTAG
32	TCATGCGCACTC	65	CACCGACATCGC	97	CGCGAATTCC
33	GTCATGCGACGA	66	CACCATCGCTAC		

2. táblázat: Az intron-targeting analízishez tervezett primerek szekvenciája.

A zárójelben feltüntetett számok a detektált fragmentumok nagyságát jelzik bázispárban. '+' : polimorf mintázat, '-' : monomorf mintázat

Marker neve	Primerek szekvenciája	Várt termék (bp)	Polimorfizmus	Génbanki szám	
<i>Ryl-In1</i>	CAAAGGGAGAGAAGATGTCAGG	827	-	<i>AJ300266</i>	
	GGAAGGTAAACGGGAGGAAG CTTCCTCCCGTTACCTTCC	(610, 190)			
<i>Ryl-In2</i>	CTTTCGAGAGGGAATCACCA AATGCAGAAGGTGCAACGAT	242	-		
	<i>Ryl-In3</i>	TGGGCGAAATTTTCATTAACA TCGAAAAATTCTCAAATGCAAA			199
<i>Ryl-In4</i>	GATTGCTTCGATAGCCTTGG CCAGCAGAGTTCACTGTTTCA	477	+		
	<i>Ryl-In5</i>	GTTTGCACAGCTGCTGAGAT GCTCTCGTCTCCACTTCTGC			(477, 200)
<i>Ryl-In6</i>	AACTCCTCAGCAACTGCACA GCTCTATCGAGGTCCATACTCG	741	-		
	<i>Gpa2-In1</i>	ACCAAAAATGCTCCATTTCG CGAAATGGAGCATTTTTGGT			(1050-190)
<i>Gpa2-In2</i>	TCCTCAGAACACCTTAACTACACG	254	-		<i>AJ249449</i>
	<i>LBr-4D6</i>	GAGTATTCATTTCGGGCTTGG CTCTACCGACCCGTAGCAAG			
<i>LBr-2G9-In1</i>	GCTGCTGGAAATCCTCACAT GCTGCCCGACTTTTCATATTC	209	-	<i>CO267884</i>	
	<i>LBr-2G9-In2</i>	TGGATCTGAAGATGGCACTG TTGCTCTCAAATCCCACACA			(480)
<i>LBr-8G7</i>		CATCCCAAGGTGTGTCATCA TTGAAATTCTTGCCGCTTTT	(620)	-	<i>DN154815</i>
	<i>gluB8</i>	ACTTGTTGGGCTGCTAATCC TTGGCAATTTTTCCATAGCA	186		
<i>mcpi</i>	TTCTTCGTTGTTCTCTTGACGA TCGAAGAGCCATCACTTGC	(490-610)	-	<i>AJ242665</i>	
	<i>kco1b</i>	GTGCAGTGGGTTCTTTTCGAG TGGCTGATCTTTCCCATCTC			999
<i>S2In</i>		CGGCCAGTTACAATTCTGC AATCCAGTGGTGGTCCAGAG	274	-	<i>AJ308597</i>
			202		

<i>Pat-In1</i>	TCATTCCGGCTACCATTCTC	504	-	
	CCTCCTGTACTTGTTCCCTCCA			
<i>Pat-In2</i>	CTTCGAACATGGCCCTAAGA	390	-	
	TTGGGCCAAAAATTGAACC			
<i>Pat-In3</i>	CAGAAGTTGCCATCTCAAGC	581	-	
	GCTGCTGCTGTGGAATAACA	(320-220)		<i>X03932</i>
<i>Pat-In4</i>	CTTGTTGATGGTGCTGTTGC	168	-	
	TCCACTTGTGCAAGTTTCGT			
<i>Pat-In5</i>	TCAAGCTCTTGATTCACAAAACA	885	-	
	AGCCTCAGAAGCATCATCCA	(1000-1100)		
<i>Pat-In6</i>	TCCAAAGACAATCCTGAAACC	906		
	TGCTTTGTTTGCTCGAAGTTT	(190-290)	+	
<i>Cat260</i>	TGACAACAAATGCTGGTGGT	260	+	
	AAGGTGGCAAGCTTCTCAAT	(260-210)		
<i>Cat199</i>	GCGGTTTTGCTGTCAAGTTT	199	-	
	GAATCGTGTCAGGGAACGAC			
<i>Cat197</i>	GCAGCTCCCAGTTAATGCTC	197	-	
	CAAACCTCGAGGGCAAATAA	(500)		<i>Z37106</i>
<i>Cat200</i>	CGAGGTTTGATCCTTGTCGT	200	-	
	CCCTGCCTGTTTGAAGTTGT			
<i>Cat232</i>	AGGAGGCGGATCTAGCCTTA	232	+	
	TGTCAAGAAAGGGGTGTCGT			
<i>Cat193</i>	TCTATCCGATCCACGAGTCA	193	-	
	CGAGAAGCAACCTTCTGACC			
<i>STACS2-202</i>	GAAGTTCACAACCCATCTGGA	202	-	
	GCAATGCCATCGTCTTTCTT			
<i>STACS2-238</i>	GCTTTGCTTGTTCCAACCTCC	238	+	
	CCGTTCTCCACCTCAAGTCT			
<i>STACS2-252</i>	CTTCCCCTTTCAAAGATGT	252	+	<i>Z27235</i>
	TCAGCAAGGCAAAACATGAG	(220-300)		
<i>STACS2-211</i>	ATGTTTTGCCTTGCTGATCC	211	+	
	CAATCTCAGCTCCGGTTCTC	(150-270)		
<i>STAC1-226</i>	GTCTTCCCCTTTCAAAGAT	226	+	
	TCAGCAAGGCAAAACATGAG	(226-300)		<i>Z27233</i>
<i>STAC1-189</i>	GCTTTTCTCCTTCCCCTCC	189	+	
	CAATCTCAGCTCCGGTTCTC	(189-280)		
<i>VPI-372</i>	CCGTGCAATCACAAAAACAT	372	-	
	TCAGCACTTTTTGCAGGAGA			
<i>VPI-198</i>	TCTCCTGCAAAAAGTGCTGA	198	-	
	TTCAAGTTGGGGGAGATGAC			
<i>VPI-657</i>	TGGAACCTTCTCGTGTTTGA	657	-	<i>AJ309218</i>
	AGAGCTGGGTTCGATTGTGTT			
<i>VPI-209</i>	TTGGCCAAATAACAAAAGCA	209	-	
	CCACACTGTATGTCGGCGTAT			
<i>VPI-184</i>	TACGCCGACATACAGTGTGG	184	-	
	CGTGCTGTCTGATTTTGCTC			
<i>Ds2-304</i>	CTGCTGGTGCCTTTGCTT	304	-	<i>AJ320154</i>
	TCTCTGCCTTGIGCTTCTCA	(280)		

<i>Sn1-556</i>	AAACTACCATGGCTGGTTCAA CCTTTGAACATCTCAGCTTGC	556	-	<i>AJ320185</i>
<i>Sn2-317</i>	CCTTCTCGAGCAAGTCCAAT AAGCGGCTTCAGAAATAGCA	317 (310-440)	+	<i>AJ312424</i>
<i>Ure615</i>	ACAGGTGACAGACCAATTCAG CATGCCATGTGCTCTCAAT	615	-	
<i>Ure271</i>	GAGCAGCCACGAGATTTGA CACAAATCAATGCCCAAGC	271	-	
<i>Ure191</i>	GGAGGATTTGGTCATTTGGA TCATCGAAAACGAAAAGCAA	191	-	
<i>Ure214</i>	TTGTAAGGCAGGTAACCCAGA TGCCAGTTGAGGGCATATAA	214	-	
<i>Ure881</i>	CAACTGGCATATGAGGCAAT CCACCTCCCACCATTGTAGT	881	-	
<i>Ure993</i>	TCAACAGACGAAATCCCCTA CATCAGGCTTGGAAGTGTG	993	-	<i>AJ276865</i>
<i>Ure207</i>	TGGAGCAATGGGACTAAAGC TCCAGATTCGTTCAAGGTGTC	207	-	
<i>Ure242</i>	TGCTTTTAAAGGTCGCACCA TTATATCCGGAGCATGTCCAC	242 (130-250)	+	
<i>Ure199</i>	CCCTCATCAACCAATCCAAC CGGGATTCAGCAAAAAGCTAC	199	-	
<i>Ure362</i>	TGGGAGACCCAAATGCTAGT AGAACTTGCAGCCTTGGAGA	362	-	
<i>Ure460</i>	TCTCCAAGGCTGCAAGTTCT TTTTATTCAGCATCCAAAGC	460	-	
<i>Adk530</i>	CTAGACGCATTTACCCGTC CAACAACACCTTTGGTGGAA	530	-	
<i>Adk412</i>	GAAGCCGTTGCTCTTATTGC TCTCCATCACGGACAAATTCT	412	-	
<i>Adk647</i>	AGCTGATGGATATCGGGAGA CAACAGATGAGGAACAGTTGGA	647	-	
<i>Adk225</i>	GACTGCATGCTTTTGACGAA TCTGGAAACGTCCCCTCTAC	225	+	
<i>Adk795</i>	GCATGGTTCTTTCCTTCCTG TGCCAGGAATTTTGCTATC	795	-	<i>AJ276864</i>
<i>Adk196</i>	GGAGGATTTGGTCATTTGGA TCATCGAAAACGAAAAGCAA	196	-	
<i>Adk214</i>	TTGTAAGGCAGGTAACCCAGA TGCCAGTTGAGGGCATATAA	214	-	
<i>Adk611</i>	ACAGGTGACAGACCAATTCAG GCCAAGTGCTTTCATTTCGAT	611	-	
<i>Adk242</i>	TGCTTTTAAAGGTCGCACCA TTATATCCGGAGCATGTCCAC	242 (130-250)	+	
<i>StKCO1-391</i>	TGATGATGATGGGGTTGTAGG TGTTGATCTTCCCCATCTC	391	+	<i>Y13048</i>
<i>Poni1b-213</i>	TTGCCTCGGAACTCTTCAG GCCTCAGAAGCAAAGCAAAT	213	-	<i>AJ309302</i>

<i>Poni1a-718</i>	GGTGGTGGTGGTAGCTCAGT	718		
	CCCATTGGCATTAACTACTCC	(718-860)	+	
	TTGCCTCGGAACTCTTCAG	442		<i>AJ309301</i>
<i>Poni1a-442</i>	GCCTCAGAAGCAAAGCAAAT	(290, 520)	+	
<i>invG-224</i>	TGGTCTCTCTTCATTGGATACC	224	+	
	TGCCCCATACTGATCCTTTT			
	GAGCAAGGGAGAAATGTTTGA	396	-	
<i>invG-396</i>	AAATTGTTTCGGCCTTGTTCA	262		
	TTCTCATGTGCTCAGATGCT		+	
<i>invG-262</i>	GAGGGCTTGACATTGCTTCA	(180-280)		
	AAGCCCTCATTGCTGGATA	232	-	<i>AJ133765</i>
<i>invG-232</i>	CCAGCACCAAACTCTCCAC	214	-	
	TCTTGATGCCCTTCAAAAC			
<i>invG-214</i>	GCCCCATACTGACCCATT	393	+	
	TGGTTACCATTTTCAGCCAGA			
<i>invG-393</i>	CCATTGAAATACATTGGTGCTG	220	-	
	ACAGGAATCACACCTGCACA			
<i>invG-220</i>	TCTGCACCCTTAAGTCCACA			
	GGGAGATGGAAGCATCAAAA	459	-	<i>M29041</i>
<i>STH-2-459</i>	GGTCACCAAATTCTTGTCATCA	438	-	<i>M29042</i>
	AACATTGAGGCTGAGGGAGA			
<i>STH-21-438</i>	CAACATGAATCTTGCTGCTTCAA			
	TGATCTTGCTCGTTTTGCTG	352	+	
<i>Mcys-352</i>	TTGCTTCACGTTCAAAACCTT	199	-	
	TGCTCGTTTTGCTATTTCAGG			
<i>Mcys-199</i>	TTCCAGCAACAACCTTGCTCTT	255	-	
	CAAATAACCCCGAGTTCCAA			
<i>Mcys-255</i>	CCAGCAACAACCTTGCTGTTTA	286	-	
	CTTGCTCGTTTTGCTGTTCA			
<i>Mcys-286</i>	CTTATTCGCCGATCAGTTG	295	-	<i>L16450</i>
	ACAGCCCCGAGTTTCAAGAT			
<i>Mcys-295</i>	TGTTGCCGCAAATGTTATGT	271	-	
	TGCTCGTTTTGCTGTTCAAG			
<i>Mcys-271</i>	CAGCATCAATTGCCACAAGT	233	-	
	CTTGCTCGTTTTGCTGTTCA			
<i>Mcys-233</i>	GCAACAAGTTGCTCTTTCACA	208	-	
	TTGCTCGTTTTGCTGTTCAA			
<i>Mcys-208</i>	TTTTCTACAACTCCAAATGACCA			
	CATCATGGATGTTTCAACAAGGA	199	-	<i>M15186</i>
<i>IHK-199</i>	CATCGCGCTTACAAGTACCA			
	TCAAAGTTTGCTCACATCATTGT	545	+	
<i>INHWI-545</i>	TCGTGCCAAGAGAGTTTCAA	(450)		<i>M17108</i>
	TGAAACTCTCTTGGCACGAA	509	-	
<i>INHWI-509</i>	TTCTGGCCACCTTTGTTTTTC			

<i>PatI-491</i>	TCATTCCAGCTATCATTCTCGF CCTCCTGTA CTGTTCCTCCA	491	-	
<i>PatI-838</i>	CGAACATGGCCCTCATATTT TGCACACGAGTTTCTCCAAG	838	-	
<i>PatI-226</i>	CAGAAGTTGCCATCTCAAGC TCCAATTCTGGAGACTTTGCT	226	-	<i>M18880</i>
<i>PatI-171</i>	CTTGTTGATGGTGGTGTTC AATGCTGGATCCTCTTGTGC	171	-	
<i>PatI-433</i>	TCAAGCTCGTCATTCACAAAA TCAGACGCATCATCCATTT	433 (370-550)	+	
<i>St4C1-1-550</i>	CAAAATTCCCTAACGCCAAA GCTTCCGTCATTCCATAACC	550	+	
<i>St4C1-1-712</i>	ACCCGGTGAAATTTGCATTA GCCTCGGGATCATTCAAGTA	712	-	<i>M26755</i>
<i>St4C1-1-179</i>	TTAICAACCACCCCGACATT GAACTTCTCCCGCTTGTTC	179	-	
<i>St4C1-1-183</i>	CAAGGATTTTCATCTCCAAGCA TTTCCTGACGGAGATTTTGG	183	-	
<i>Suc-197</i>	TCGCCAAGATGACAAAAACA ATAGCAAGTGCAACCCAAGG	197	-	
<i>Suc-208</i>	AGGAGCTGTCTGTCCCTGAG TTGGTGAGGGTTGGTTTAGG	208	-	<i>U21129</i>
<i>Suc-314</i>	TCACCGCAATGAGATACTGC CTTTTCCGTGGCTTTCGAT	314 (250-390)	+	
<i>GPSS-987</i>	GCCAAAGGCTGTTTCTGATT ATAAAGTCGGGTCCCAGCTC	987	-	
<i>GPSS-199</i>	CAGAGAAACCGCAAGGAGAG CCCATACTGGCAATGAAAGG	199	-	
<i>GPSS-359</i>	TGCTCCTCAAACAACCACAG AAGTCCAGAGAACCCCGATT	359	-	
<i>GPSS-203</i>	TGTGACATCAGCATCAAGCA AGCCGGTGCCAGATTTTAG	203	-	<i>L36648</i>
<i>GPSS-547</i>	TGCAACTTCACTTGGGATGA TCCTTGAGATCAGCAGAATTACC	547	-	
<i>GPSS-943</i>	TCATTGGTGAAGGTTGTGTGA ACCACGGAATGGTGAATCTT	943	-	
<i>GPSS-275</i>	CTTTTGATGGGGGCAGATTA CAGCTTCCTGTCAGCATCAG	275 (220-790)	+	
<i>GPSS-255</i>	CCCGTATAGGGGACAATGTG CCCTAGCCGCTTCTTGAAC	255	-	
<i>UBQ-627</i>	TCTCAATTGCCTTCAAATTTCTC TCCGGTGAGAGTTTTCACAA	627	+	<i>U26831</i>

<i>Suc65-197</i>	TCATCGCAATGAAATTTTGC CTTTTCCGTGGCTTTTCGAT	197	-	
<i>Suc65-224</i>	GCTGCTGGCTGAGTTTGAAT ACCCATGGGGGTAAAACAAT	224	+	
<i>Suc65-200/1</i>	TGTTGAGGAGCTGACTGTGC GCAGTGAAGGGCTCAAAATC	200/1	-	
<i>Suc65-235</i>	AGGAAAGCATGACCCCTCTT GCCTTCCTCAGGACTTTTTG	235 (200-390)	+	
<i>Suc65-201</i>	TATTTGCCCCAGGAAAATGT CTTGCTCCTTTATGCGCTTG	201	-	
<i>Suc65-209</i>	GATCAAGTTCCTGCCTTGA GTGGTACCAACTGCATCAGG	209	-	
<i>Suc65-203</i>	GGGTCCCCTTAGGACTGAG CGGTTATCTCTTTCCCCACA	203	-	<i>U24088</i>
<i>Suc65-183</i>	AAACCTTGCAGCCTCCTTGT TGGTTTTCTCCAATGCATGA	183	-	
<i>Suc65-210</i>	CCAGCACCTTCCAGGAGATA TTTGGGATCGAACACATCAA	210	-	
<i>Suc65-177</i>	CCCTGAAATCGAAGACTTGC TGCCATGGTGAATATGATGG	177	-	
<i>Suc65-200/2</i>	CACATTGGGAAGCCATTCT GTGCTTCCAGAACCCGTAAA	200/2	-	
<i>Suc65-200/3</i>	GTTTACGGGTTCTGGAAGCA CTCAACAGCCAATGGAACAA	200/3	-	
<i>Suc16-321</i>	TCACCGCAATGAGATACTGC TATCCCTTTTCCGTGGCTTT	321 (290-390)	+	
<i>Suc16-197</i>	TCGCCAAGATGACAAAAACA ATAGCAAGTGCAACCCAAGG	197	-	
<i>Suc16-201</i>	GTCCGTCCCTGAGTATTTGC TTGGTGAGGGTTGGTTTAGG	201	-	
<i>Suc16-331</i>	TTCTTCGCGCTCACCATTAT CCTCTGCCTTCCTTAGGACAT	331	+	
<i>Suc16-202</i>	CTTGGAGCGTGAAATGCTTA CTGACCACAAGTGGTTCCAA	202	-	<i>U24087</i>
<i>Suc16-199</i>	TGGCCATACATGGAGACATT AGCAAGATTGCCCTCACTGT	199	-	
<i>Suc16-195</i>	GGCAATCTTGCTGCTTCTTT TGTCGGAATCAGGATACTTCG	195	-	
<i>Suc16-208</i>	CCAGCACCTTCCAGGAGATA ATGTTGAATTTGGGGTTCGAA	208	-	
<i>Suc16-196</i>	TGCAAGAGAGAGCCTTCACA AGCAGCCAGTGTCAATAGCC	196	+	
<i>Suc16-349</i>	TGACGTTGAGAATGACGAACA CCAACCTTGCCATTGTGAAT	349 (280-410)	+	

3. táblázat: A markerek térképi helyének meghatározásához használt CAPS markerek primerjeinek szekvenciái

Marker	primer	Primer szekvenciája	Kapcsoltság i csoport	Restrikciós enzim
<i>Dbe</i>	<i>Dbe</i> - f	5' - CTG ATG TCA GCA TCT ATG AGC T - 3'	XI	<i>TaqI</i>
	<i>Dbe</i> - r	5' - GAT ACG ACA AGG ACC ATT TGC A - 3'		
<i>SutI</i>	<i>SutI</i> - f	5' - AGC TTC CAT AGC TGC TGG TGT T - 3'	XI	<i>RsaI</i>
	<i>SutI</i> - r	5' - CGG ACT AAG GTT AAG GCT ATG G - 3'		
<i>Tall</i>	<i>Tall</i> - f	5' - ATT CCT TGT GTG TCA AAT GCT CC - 3'	XI	<i>TaqI</i>
	<i>Tall</i> - r	5' - CGA CTA ACG AAG AAT GAA GCA AC - 3'		
<i>ShkB</i>	<i>ShkB</i> - f	5' - CAT CTT CTC CAT AAC CCT TTA CC - 3'	XI	<i>RsaI</i>
	<i>ShkB</i> - r	5' - GCT CAC AGT TCT CCA CAA AAT C - 3'		
<i>Sus4</i>	<i>Sus4</i> - f	5' - CAA GCT GAC CTG GAC ACC ACA GT - 3'	XII	<i>TaqI</i>
	<i>Sus4</i> - r	5' - ACC ACA TTG AAA ACC ATA GGA ATT CT - 3'		
<i>Ppe</i>	<i>Ppe</i> - f	5' - TCC GTC CAT CCT TTC TGC TAA C - 3'	XII, III, V	<i>AluI</i>
	<i>Ppe</i> - r	5' - AAC TCC ACC ATC AAC TTC AAT C - 3'		

4. táblázat: A markerek kromoszómális pozíciójának meghatározásához használt SSR markerek primerjeinek szekvenciái

Marker	Primer	Primer szekvenciája	Kapcsoltsági csoport
<i>STM003</i>	STM0037f	5' -AATTAACTTAGAAGATTAGTCTC - 3'	XI.
7	STM0037r	5' - ATTTGGTTGGGTATGATA - 3'	
<i>STM100</i>	STM1009f	5' - ATTAGCATACGACTCAAC - 3'	XI.
9	STM1009r	5' - TTATTTTCATTTTTCAGC - 3'	
<i>STM200</i>	STM2005f	5' - TTAAAGTTCTCAGTTCTGCAGGG - 3'	XI.
5	STM2005r	5' - GTCATAACCTTTACCAATTGCTGGG - 3'	
<i>STM002</i>	STM0025f	5' - GTTCATGATTGTGAATGCTC - 3'	XI.
5	STM0025r	5' - ATGACTCAACCCCAAATG - 3'	
<i>STM000</i>	STM0003f	5' - GGA GAA TCA TAA CAA CCA G -3'	XII.
3	STM0003r	5' - AAT TGT AAC TCT GTG TGT GTG -3'	
<i>STM000</i>	STM0007f	5' -GGA CAA GCT GTG AAG TTT AT -3'	XII.
7	STM0007r	5' -AAT TGA GAA AGA GTG TGT GTG -3'	
<i>STM001</i>	STM0014f	5' -GAT TGT GAG AAG GCA CTG A -3'	XII.
4	STM0014r	5' -TAA ACA ATG GTA GAC AAG ACA AA -3'	
<i>STM003</i>	STM0032f	5' - GGC TGC AGG AAT TAT GTG TTC -3'	XII.
2	STM0032r	5' -GAT GTA AAA CAC GTG TGC GTG -3'	
<i>STM003</i>	STM0030f	5' -AGAGATCGATGTAAAACACGT - 3'	XII.
0	STM0030r	5' -GTGGCATTTTGATGGATT - 3'	
<i>STM004</i>	STM0040f	5' -GCAATAATGGCCAACACTTC - 3'	XII.
0	STM0040r	5' -TGGGAAATGTTAGTCAAAAATAGC - 3'	
<i>STM104</i>	STM1045f	5' -GAAGTTTTATCAGAATCC - 3'	XII.
5	STM1045r	5' -ATCACCTCATCAGCAATC - 3'	
<i>STM202</i>	STM2028f	5' -TCTCACCAGCCGGAACAT - 3'	XII.
8	STM2028r	5' -AAGCTGCGGAAGTGATTTTG - 3'	

5. táblázat: Az AFLP vizsgálathoz használt primerek szekvenciája

Marker	Primer	Primerek szekvenciája
<i>M17</i>	92E11	5'-GAC TGC GTA CAT GCA GTG-3'
	92G24	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'
<i>M45</i>	92E08	5'-GAC TGC GTA CAT GCA GCT-3'
	92F44	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AGG A-3'
<i>M5</i>	92E11	5'-GAC TGC GTA CAT GCA GTG-3'
	92F41	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3'
<i>M6</i>	92E08	5'-GAC TGC GTA CAT GCA GCT-3'
	92F42	5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAA-3'

6. táblázat: Az STS és CAPS markerek kimutatásához használt primerek szekvenciái

Marker	Primer	Primer szekvenciája
<i>GP81</i>	GP81f	5'-GCA GCG TTT CCT ACA AT-3'
	GP81r	5'-AGA GAC TAA TGC TGA AAA T-3'
<i>GP122</i>	GP122r	5'-TAT TTT AGG GTA CTT CTT TCT TA-3'
	GP122f	5'-GCA CTC AAT AGC CCT TCT T-3'
<i>GP269</i>	GP269f	5'-TCG CAA TGA AAG ATA AGC-3'
	GP269r	5'-TGT GAT AAA GAG TGT AGC AGT C-3'
<i>GP204</i>	GP204f	5'-CAT AGA TGG CTC AAA CAA CTC-3'
	GP204r	5'-GTG GAA ACA TGG CTT ACC-3'

7. táblázat: Song (2004) által fejlesztett specifikus primerek szekvenciái

Marker	Primerek	A primer szekvenciája
<i>U5-1</i>	U5-1f	5'-TGC AGG AGA TAG CAG CCA GA-3'
	U5-1r	5'-TGT GAG CTC TGA CCG ACC AA-3'
<i>U5-2</i>	U5-2f	5'-TGC AGG AGA TAG CAG CCA GA-3'
	U5-2r	5'-TAA CAT TTA GCC TCT GAA C-3'
<i>2H</i>		5'-TGC AGG AGA TAG CAG CCA GAA
	2Hf	GGA ACA GTA AAC ACA ACT AAC-3'
	2Hr	5'-TAA CAT TTA GCC TCT GAA CGT
		AGG ATC CGA CAA CAC AAG C-3'

8. táblázat: Az egyes genotípusok rezisztencia tulajdonságai

Vonal	Rez	Vonal	Rez	Vonal	Rez	Vonal	Rez	Vonal	Rez	Vonal	Rez.
1	+	34	-	67	-	100	-	133	-	166	+
2	+	35	-	68	-	101	+	134	+	167	+
3	+	36	-	69	-	102	-	135	-	168	-
4	-	37	-	70	-	103	-	136	-	169	+
5	-	38	+	71	-?	104	+	137	+	170	+
6	+	39	-	72	-	105	+	138	-?	171	+
7	+	40	-	73	-	106	+	139	-?	172	+
8	+	41	-	74	-	107	-	140	-	173	-
9	+	42	-	75	+	108	+	141	+	174	-
10	-	43	+	76	+	109	-	142	-	175	+
11	-	44	-	77	+	110	-	143	-	176	-
12	-	45	+	78	-	111	+	144	+	177	-
13	+	46	+	79	-	112	+	145	+	178	?
14	-	47	+	80	-?	113	-	146	+	179	+
15	+	48	+	81	+	114	-	147	-	180	+
16	-	49	+	82	-?	115	+?	148	-	181	+
17	+	50	+	83	+	116	+	149	+	182	-
18	-	51	+	84	+	117	+	150	+	183	-
19	-	52	+	85	+	118	+	151	-	184	-
20	+	53	-	86	-	119	+	152	+	185	+
21	-	54	+	87	-	120	-	153	-	186	+
22	+	55	+	88	+	121	+	154	+	187	-
23	-	56	-	89	-	122	+	155	+	188	+
24	-	57	-	90	-	123	-	156	+	189	+
25	-	58	+	91	-	124	+	157	+	190	+
26	+	59	-	92	-	125	-	158	+	191	-
27	+	60	-	93	-	126	+	159	+	192	-
28	+	61	+	94	-	127	+	160	+	193	+
29	-	62	+	95	-	128	-	161	-	194	+
30	+	63	+	96	+	129	+	162	-	195	+
31	-	64	+	97	-	130	-	163	-		
32	+	65	-	98	-	131	+	164	+		
33	-	66	+	99	-?	132	-	165	-		

'+' = rezisztens genotípus, '-' = fogékony genotípus, a kérdőjellel jelzett vonalak csak egyetlen egyedet tartalmaztak, így kimaradtak a vizsgálatokból

1.a ábra: A *RAPD6846* marker szekvenciája. A szürkével jelölt szekvencia a 46-os primer kapcsolódási helyét jelöli.

```

1  AGTGCATCGT  GCTCNGATTA  TCAACCNANT  CCTGCTGTTT  TGGCCTTGGA  AGATAACAAA  60
61  GGAAATACAG  CACATCNTAT  TGCNACAAGA  AAGGGACGGA  TACAGGTTTG  TTTGTTTAAC  120
121 ATGTTTTTTC  TTGTAAAGCA  TCGTCCGTAA  ACTTGAGATT  TGTTTTATGT  GTGAGGCAAT  180
181 GTGGGATGTG  TTCTATATCT  TGATGAANAA  TGCTGGTAGA  TCAAGGGAAT  ACTGTTTATT  240
241 TGGTAAAATC  AAGATGGGAA  TTACAAACTT  GAGGGATTGT  GGGCAGGCCA  ACTTGAGGGA  300
301 TTGTGGCAGG  CCAAGGGTAA  GTTCATTGTC  GTGCCACGAA  ATGGTTATTG  AAATGACTTA  360
361 CTGATAAGTT  CCAGTTTCCT  TTCTGGATAG  TTATGTACCT  GGAGAGAAGG  AACATTCAGA  420
421 AACATTTAAT  CTTTTAGTAT  CATGTATCGT  GTTCTCCCGC  ATGAGGTCTG  ATTCATTCT   480
481 ATGACTTGCA  GGGATTTGGT  CAGCCTCCGT TACTCCAA  540

```

1.b ábra: A *RAPD9621* marker rész szekvenciája.

```

1  GTAATCTTTC  GGCTGCATTT  TACTCCAGAA  CTCCTCGGCC  TTCGGCCTCA  CTGATCGGCC  60
61  TTTTAAGCTG  CTCTTCTTTC  TGCACCNCT  GGGATAGCTC  TTCTGGTATG  CAGCACCTGC  120
121 CGGATCTAGT  CATACTTGG  GTAACAGCCG  TTTTCGATCAC  GAACTTCGGT  CGGGCAAGAG  180
181 TTTCTCGTGG  CACCAAGGCA  GCAACCTTCT  TAGGTGTCAA  AATCACAAAC  TCTTCTTCT  240
241 CTTTGATACT  TAACGAAGCC  ACAGCCCTTT  CCAGGTTATC  AGGAGCGATC  GGAATTATTG  300
301 ACTTTGCTAC  GAACCCATCA  TCATCTGTCT  CTATCATATT  GATAGTGACG  CCTCCGTGAT  360
361 TTGGCAAGGG  ATTACTATTG  ACGTTGGGCT  CGACTGTCTG  GAGAGAGACC  ACTTCTGGT  420
421 CGATCAGGTC  TTGGATTTTG  TGCTTCAAGT  TGATACAGTC  CTCGGTATCA  TGTCCAATAT  480
481 TGTTGGAGTG  ATACGCACAC  CTCTGATCAG  GTCTGTAAAA  CTTTGAGCTG  GTGTCAACCG  540
541 GTTTGGGCC  CACTGGATGA  ATATAGCCTG  CCGCGTTTAA  TCGCTCGAAC  AACTTCGTGC  600
601 GGCTTTC AAC  AAGCGGAGTG  AAAACTCTGG  CAGGCTTCTT  CTCAAATCTA  GGACGAGGGG  660
661 GATCGTAGTT  GCCTTGTTGA  GGAGGAGGCA  TTTGACGATN  ATTTGGAGCA  TTTGGGCGAA  720
721 GGGATTGACA  TCTAGGATAT  GCATTGGTTT  GATGATTTGG  GTTGTTGAGC  TTGGTAGTTC  780
781 CGGGGGGGGT  AAAACCCCA  AANTGGNACC  TGGNGGAAG  GANTTTGGGN  AATTGGCTTC  840
841 NAATTGTTTCG  CCCCCCNCC  CCCCCTTNA  ATTTCCCCC  CCCCAACAAG  900

```

1.c ábra: A *RAPD9607* marker rész szekvenciája.

```

1 CTCCTTACGA GCTTACCTTN NATTGAAGAT ACAANTTAGC ATAATCTTCT GCCGAATGAG 60
61 TAGTCTTTAT CGGCAAAAAG TGGGCTGATT TTGTCATTCT GTCNTTAATC ACCCAAATAA 120
121 AATCATGCTG CCTGCGAGAC CTTGGTAAAC CTATGATGAA GTCCATATTA ATCATCTCCC 180
181 ACTTCCATTC TAGAAGTTCC ATATTCTGAG CCAAACCACC GGGCCCTTGG TGCTCTACTT 240
241 TAACTTGTTG GCAATTTGGG CACTTAGCAA CAAATTCTAC AATTCCCTTC TTCATCACCA 300
301 CTATTCCTCT TTCTGTGGAA TCCATTAGTC GGACTCCTAA GAGTGCAAGA CATGCACATC 360
361 TTTGCGTAAC TCTCTCTTTT CCTCCTCAAC ATGGGCAGTA ATACCCATAG ACAACCTGCT 420
421 TAAAGCATCA GCAACAACAT TAGCCTTACA TGGGTGATAA AGAATACTCA TGCATAATC 480
481 TTTGAGTAAT TCCAACCGCC TCCTTTGTCT GAGATTGAGC TCTTTCTTAG TAAACACATA 540
541 CTGAAGGCTC TTGTGATCGA TGAACACATC CACATGAACA CCATAAAGAT AATGACGCCA 600
601 TATTTTCAAA GCAAATACTA CGGCAGCCAA CTCCGGGATC ATGGGTGGG TAATTCTTCT 660
661 CATGAACTTT CAACTGTTTG GAGGCATAAG CTATAACTTT GCCATTCTGC TTTAACACAC 720
721 AACCCAAACC AATTCTAGAC GCCGAATTCA ATCACTAGTG CGGGCGGCCT GCAAGGTCGA 780
781 CCATATTGGA AGAGCTCCCA AACGCCGTTN GGCCNGCATA GCTTGGAAGT ATTCTATAGT 840
841 GGTCACCCTA AAATAACCTT GCGGTTACCC ATGGNCCCTA NNCTGGCTCC CCGNGGTNGA 900
901 AANCNCCCCC CCCCCCCC 960

```

1.d ábra: A *RAPD7039* marker szekvenciája. A szürkével jelölt szekvencia a 70-es primer kapcsolódási helyét jelöli.

```

1 GATNGTTNGA TTCAATATTT ATATAATTGT ATGTGGATAC AAATTATAAT TGTTAATATA 60
61 CATGATATAA ATTATTTGCA TCAATGAATT GAATACAAAT GTCTTTGATA CAATTGTATT 120
121 TACATTAATA TAAATCAATC AATTGTATCA ATTATATAAA TGATACAATT ATTGATAGAT 180
181 ATATAAATTA ATTGTACATC ACTTTCCTAG ATTTCGTTTCG CCTCTCTCCT CCCTCTCACA 240
241 ATCTCGCTCA CCTCTCTCCT CTTAGTAATT AGTTTTTAAG CAAATCAATT GTATTTGTTA 300
301 GGGGTGATGA 360

```

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Taller Jánosnak a szakmai segítségéért, tanácsaiért, és munkám irányításáért.

Köszönettel tartozom a Burgonyakutatási Központ munkatársainak a fertőzési tesztek elvégzésében nyújtott szakmai segítségükért, valamint a vizsgálatokhoz felhasznált genetikai alapanyagok előállításáért, fenntartásáért.

Köszönöm a Pannon Egyetem, Növénytudományi és Biotechnológiai Tanszék Biotechnológia Laboratóriumában dolgozó kollégáimnak biztatásukat és segítségüket.

Köszönöm Christine Hackett-nek (Biomathematics & Statistics Scotland, Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland, UK) és Zewei Luo-nak (School of Biosciences, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham UK) baráti együttműködését és segítségét.

Végül de nem utolsó sorban hálás vagyok Családomnak és a Páromnak türelmükért, és támogatásukért, amely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.