

PANNON EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
KESZTHELY

NÖVÉNYTERMESZTÉS ÉS KERTÉSZETI TUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Készítette:

Cernák István

Okleveles agrármérnök

Témavezető:

Dr. Taller János

Tudományos főmunkatárs, PhD

Keszthely

2008

1

1. A kutatómunka előzményei és célkitűzései

A burgonyanemesítés legfontosabb feladata - a kiváló beltartalmi értékekre és egyre nagyobb produktivitásra történő nemesítési célok mellett - az abiotikus és biotikus stresszekkel szemben ellenálló fajták előállítására. A környezet terméscsökkentő hatásaira kevésbé érzékeny fajták termesztésbe vonásával a termelés kockázata csökkenthető, így a növény mind a számára kedvezőtlen időjárású években, mind pedig a kórokozóval fertőzött területeken nagyobb biztonsággal termeszthető.

Magyarországon a burgonya termesztés szempontjából a vírusok jelentik a legnagyobb kockázatot, hiszen komoly szerepet játszanak a leromlásban és a terméskiesésben. A víruskórokozók között – a burgonya levélsodródás vírus mellett - legnagyobb jelentősége a burgonya Y vírusnak (PVY) van (Horváth et al. 1995). A vírusfertőzés termésmennyiségre és annak minőségére gyakorolt negatív hatását több hazai felmérés is egyértelműen kimutatta (Wolf et al. 1996, Horváth és Wolf 1999, Wolf és Horváth 2000), így a vírusok elleni védekezés és az általuk okozott kár mérséklésének lehetőségét régóta vizsgálják (Wolf 2001).

A vírusok terjedésének biológiájából adódóan kemikáliákkal csak korlátozottan védekezhetünk ellenük, így agronómiai és környezetvédelmi szempontból is a legcélravezetőbb megoldást a vírus kártételének megakadályozása jelentheti, amelyet leghatékonyabban rezisztens fajták előállításával, és termesztésbe vonásával biztosíthatunk (Swieżyński 1994).

Az új rezisztens fajták előállításában nagy jelentősége van a vad *Solanum* fajoknak, mint rezisztencia-forrásoknak. A PVY-al szembeni rezisztencia kialakítására több európai nemesítési programban – így Keszthelyen is - elsősorban a *S. stoloniferum* fajból eredő PVY extrém rezisztencia gént ($R_{Y_{sto}}$) használják (Valkonen et al. 2008). A keszthelyi nemesítésű fajtákat, a

PVY legveszélyesebb – a világon először Magyarországon azonosított - PVY^{NTN} törzse (Beczner et al. 1984) sem képes megfertőzni.

A rezisztencia gének beépítése a termesztett burgonyába azonban rendkívül idő és költség igényes folyamat (Watanabe 1994). A markerekre alapozott szelekció (MAS) gyakorlati alkalmazásával a fajták előállítás ideje azonban lerövidíthető, ezáltal költségtakarékosabbá tehető. Mindezek előfeltétele azonban az adott tulajdonsághoz szorosan kapcsolt markerek detektálása.

Elsőként Brigneti és munkatársai (1997) azonosítottak négy - a *Ry_{sto}* génnel kapcsolt - AFLP markert melyeket – tehát a gént is - a burgonya XI kromoszómájára lokalizáltak. A gén klónozására tett kísérletük azonban sikertelen volt (www.cipotato.org), amit Gebhardt és Valkonen (2001) a vizsgálatokhoz használt növényanyag valószínűsíthetően pontatlan pedigréjével magyaráztak. Később a gént CAPS, STS valamint SSR és AFLP markerek alapján két kutatócsoport is a burgonya XII. kromoszómájára térképezte (Flis et al. 2005, Song et al. 2005).

A fent említett okokat figyelembe véve a jelen 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 jelentőséggel bíró eredményeit a Keszthelyen folyó rezisztencia nemesítési programokban tervezzük hasznosítani.

2. Anyagok és módszerek

Növényanyag

Markerezéshez, térképezéshez használt populáció

A génnel kapcsolt markerek azonosításához és térképezéséhez használt – a *Ry_{sto}* génnel nézve - hasadó F₁ populációt a keszthelyi nemesítésű White Lady (WL) valamint az S440 nemesítési vonal keresztezésével állítottuk elő. A keresztezésben anyai vonalként szereplő WL hordozza a *S. stoloniferum* vad burgonya fajtából származó *Ry_{sto}* gént, míg az S440 vonal (Wisconsin University, USA) fogékony a vírusra.

A keresztezés során 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.

A markerek alkalmazhatóságának vizsgálatához felhasznált fajták, és populációk

Vizsgálataink során a markerek alkalmazhatóságának ellenőrzésére összesen 21 magyar, holland és német burgonya fajtát vontunk be a vizsgálatokba. A fajták közül tíz a *Ry_{sto}*, míg két fajta a *S. chacoense* vad fajtából származó *Ry_{che}* PVY extrém rezisztencia gént hordozza. Kilenc fajta fogékony a burgonya Y vírusra.

A markereink alkalmazhatóságát ugyanakkor egy - jó chips tulajdonságokkal és PVY extrém rezisztenciával rendelkező - új fajta előállítására irányuló nemesítési program keretében végzett, három keresztezés (WL x S438, Rioja x S440, WL x Impala, WL x S438) összesen 189 F₁ utódján, valamint a WL és S440 között készített újabb keresztezés eredményeként kapott 502 F₁ genotípuson is megvizsgáltuk.

A keresztezésekben felhasznált két magyar fajta (WL, Rioja) szimplex állapotban hordozza a Ry_{sto} gént, míg az Impala, valamint a két nemesítési vonal (S440, S438) fogékony a vírusra.

PVY rezisztencia vizsgálata

Fertőzés és DAS-ELISA vizsgálat

A fertőzési tesztek során a hasadó populáció 195 F₁ genotípusának minden egyedét 4-6 leveles állapotban, gumószámától 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, közben a növényeket DAS-ELISA-val vizsgálatuk (poliklonális antitest, Löwe Biochemica GmbH., Germany). A vizsgálatok során csak azokat a genotípusokat tekintettük rezisztensnek, amelyek minden egyede, tünetmentes volt, és a szerológiai vizsgálatok során is negatív eredményt adtak.

Molekuláris analízis

DNS tisztítás, Bulkok képzése és RAPD analízis

A növényekből a DNS-t Walbot és Warren (1988) eljárása alapján izoláltuk, amelyen kisebb módosításokat végeztünk.

A hasadó populáció egyedeiből – a szerológiai vizsgálatokban kapott eredményeknek megfelelően - 10 PVY rezisztens és 10 a vírusra fogékony növényt véletlenszerűen kiválasztva rezisztens és fogékony csoportokat képeztünk. Később a csoportot alkotó egyedek számát 25-25-re emeltük.

A RAPD analízis során a PCR reakciót mintánként 20µl reakció eleggyel végeztük, amely a következő komponenseket tartalmazta: 20 ng templát DNS, 2 mM dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 mM 10 x 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 (Metabion, Germany), 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 db primer, mintegy 3000 kombinációjával teszteltük végig a két csoportot, valamint a szülők DNS mintáit. 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 PCR reakció során kapott termékeket 1,5 %-os agaróz (Promega, USA) gélen választottuk szét, majd ethidium-bromidos festéssel tettük láthatóvá. A mintázatot a Syngene GeneGenius géldokumentációs rendszerével detektáltuk és értékeltük.

Intron-targeting módszer

Százhuszonkilenc primerpárt terveztünk különböző a nyilvános adatbázisokban elérhető burgonyából származó DNS és EST szekvenciák alapján, amelyek – a szekvenciák elemzése és a homológia vizsgálatok eredményei szerint - a valószínűsíthető intront határoló exon régióba tapadnak be, és így az intron amplifikálható.

A vizsgálatok során használt PCR 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.

A PCR reakció során kapott termékeket a RAPD vizsgálatoknál leírtak szerint mutattuk ki.

Ry_{sto} gén térképezése

Funkcionális markerek vizsgálata és mikroszatellit analízis

A RAPD marker lókuszok és a gén térképi helyének meghatározásához – más kutatócsoportok eredményeit figyelembe véve (Brigneti et al. 1997, Flis et al. 2005, Song et al. 2005) - leteszteltük a Chen és munkatársai (2001) által a XI. és XII. kapcsoltsági csoportba térképezett CAPS markereket valamint megvizsgáltuk a Milbourne és munkatársai (1998) által fejlesztett a burgonya XI. és XII. kromoszómájára lokalizált mikroszatellit (SSR) markereket.

A vizsgálatokat minden esetben a szerzők leírásai alapján végeztük el.

Ry_{sto} génhez kapcsolt egyéb markerek alkalmazhatósága

A markerek pontos helyzetének meghatározásához és a szelekciós rendszer kibővítésének céljából leteszteltük a már közölt a Ry_{sto} génnel kapcsolt markereket az általunk előállított térképező populációban.

Ennek során megvizsgáltuk a Brigneti és munkatársai (1997) által azonosított négy, a Ry_{sto} génnel kapcsolt AFLP markert, majd leteszteltük Flis és munkatársai (2005) valamint a Witek és munkatársai (2006) által publikált, a Ry_{sto} génnel kapcsolt STS és CAPS valamint a Song (2004) által közölt – egy a génnel kapcsolt AFLP marker szekvenciája alapján fejlesztett - három lókusz specifikus markert is. A vizsgálatokat mindhárom esetben a szerzők leírása alapján végeztük.

RAPD marker szekvenálása és specifikus primerek tervezése

A RAPD markereket reprezentáló DNS szakaszokat az agaróz gélből kivágtuk, és visszatisztítottuk (SpinPrep Gel DNA Kit, Novagen). A marker

fragmentumokat közvetlenül szekvenáltattuk (Biotechnológiai Kutató Központ, ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer).

A marker fragmentumok bázissorrendje alapján a *Primer3* szoftverrel (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) specifikus primereket terveztünk.

3. Új tudományos eredmények

A kapott eredményeket a szakirodalomban megjelent eredményekkel összevetve a következő új tudományos eredmények elfogadására teszünk javaslatot:

a. A burgonya legveszélyesebb kórokozójával a burgonya Y vírussal (PVY) szemben teljes védeltséget 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 (*RAPD6846*, *RAPD9621*, *RAPD9607*, *RAPD7039*) a génnel szorosan kapcsolatos. A génhez közelebb térképeződött markerekből a *RAPD7039*-et sikeresen SCAR markerré alakítottunk.

b. Meghatároztunk két SSR markert (*STM0003-111*, *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 lokuszok-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 *STM0003-111* valamint a *GP122₅₆₄* 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* markerek jó kiindulási alapot képezhet a *Ry_{sto}* gén térkép alapú izolálásához. E munkához a szükséges BAC klóntárat a White Lady -ből elkészítettük.

e. A gén két oldalán elhelyezkedő (*STM0003-111*, *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.

A doktori disszertációhoz kapcsolódó 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, Vaszily 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 Z, 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 Z. (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. Növény-nemesítési 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. Növény-nemesítési 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 hiperszenzitív válasszal kapcsolatba hozható QTL markerezése. XIV. Növény-nemesítési 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:

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.

Taller J, **Cernák I**, Alföldi Z (2001) Molekuláris eszközök alkalmazása egy hiperváltozékony 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.

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 keszthely térségi fehér fagyöngy (*Viscum album* L.)
populációk genetikai vizsgálatáról. XVI. Keszthelyi Növényvédelmi
Fórum. 2006. január. 27.