

PANNON EGYETEM
GEORGIKON KAR

NÖVÉNYTERMESZTÉSI ÉS KERTÉSZETI TUDOMÁNYOK
DOKTORI ISKOLA

Iskolavezető:

Dr. Kocsis László, DSc

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**BURGONYA REZISZTENCIAGÉNEK VIZSGÁLATA,
KÜLÖNÖS TEKINTETTEL GÉNEXPRESSZIÓS
MEGKÖZELÍTÉSEKRE**

Készítette:

RAHIM AHMADVAND

Témavezetők:

Dr. Polgár Zsolt, CSc

és

Dr. Taller János, PhD

KESZTHELY

2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	2
2. KUTATÁSI CÉLOK	3
3.1. Növényanyag.....	4
3.1.1. PVX fertőzési vizsgálatok	4
3.1.2. Az <i>Rx1</i> és <i>Rx2</i> gén azonosítására fejlesztett markerek alkalmazhatóságának vizsgálata	4
3.1.3. Intron-targeting (IT) markerek fejlesztése	7
3.2. DAS-ELISA teszt	8
3.3. PVX rezisztencia tesztek	8
3.3.1. Mechanikai fertőzés.....	8
3.3.2. Oltvány fertőzés.....	8
3.4. Genomi DNS izolálás	8
3.5. PVX rezisztencia gén azonosítása	9
3.5.1. Marker analízis	9
3.5.2. <i>Rx</i> génekre specifikus markerek fejlesztése	9
3.6. <i>Rx</i> gének kimutatására alkalmas multiplex PCR fejlesztése	9
3.7.1. A kórokozókkal történő fertőzések	10
3.7.1.1. Fertőzés PVX és PVY vírussal	10
3.7.1.2. Fitofórával történő fertőzés.....	10
3.7.2. mRNS izolálás	10
3.7.3. mRNS előkészítése további vizsgálatokhoz	11
3.7.5. Szubtraktív hibridizáció.....	11
3.7.5.2. A cDNS klóntár létrehozása és tesztelése PCR technikával	11
3.7.5.3. cDNS klónok szekvenálása és szekvencia elemzése.....	11
3.7.6. NGS transzkriptom analízis	11
3.8. Intron-targeting markerek fejlesztése az NGS adatok alapján.....	12
4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	12
5. IRODALOMJEGYZÉK.....	13

1. BEVEZETÉS

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) a búza és a rizs után a harmadik legfontosabb kultúrnövényünk. A FAOSTAT adatai szerint a burgonyatermesztés volumene 2009-ben 17,6 t/ha termésátlag mellett elérte a 329,58 millió tonnát; világszerte összesen 18,65 millió hektáron termesztik. Fontosságát hangsúlyozva, az ENSZ a 2008-as évet a Burgonya Nemzetközi Évének nyilvánította. A burgonyát 149 országban termesztik (Hijmans and Spooner, 2001), melyek közül az öt legfontosabb: Kína, India, Oroszország, Ukrajna és az Egyesült Államok (FAO Statistics, 2008). A növény számos gomba, baktérium és vírus kórokozóval szemben fogékony, ezen felül fonálféreg és egyéb kártevők is megtámadhatják. A *Phytophthora infestans* okozta burgonyavész mellett legfontosabb kórokozó növényi vírusok (Ross, 1986). A mintegy 40 eddig ismert burgonyavírus kártétele fokozatos termésnövekedéssel társuló minőségi leromlásban mutatkozik meg, ami hatással van a szántóföldi kultúrában az alkalmazandó agrotechnikára, szállításra, illetve az adott területen termesztendő fajtákra is. Elterjedtségüket és terméshozamra gyakorolt hatásukat tekintve kiemelkedő jelentőséggel bírnak a burgonya levélsodródás vírus (PLRV), valamint a PVY, PVX, PVA, PVS, és PVM vírus (Salazar, 2003). E kórokozókkal szemben hatékony védekezési módot - a költségeket és a fenntarthatóságot is szem előtt tartva - a rezisztens fajták termesztése jelenti. E tekintetben, az egyik legeredményesebb nemesítési programot a Pannon Egyetem, Burgonyakutatási Központja folytatja Keszthelyen. A több mint 50 éves nemesítési munka eredményeként több mint 12 államilag elismert PLRV valamint PVX, PVY, és PVA vírussal szembeni komplex ellenállóságot biztosító fajtát hoztak itt létre. A hiányos korai pedigre adatok miatt a rezisztenciát biztosító gének egy részének eredete bizonytalan. A termesztett burgonya magasan heterozigóta, aminek fenntartása a beltenyésztésből adódó leromlás miatt szükséges a burgonyánál. (Gebhardt and Valkonen, 2001).

A molekuláris markerek értékes eszköztárt jelentenek növénynemesítésben, mivel jól használhatóak monogénes,- illetve poligénes tulajdonságok jellemzésére és hasznosítására. Továbbá, a burgonyagenom szekvenálása új lehetőségeket kínál a génizolálás és a funkcionális jellemzés területén (PGSC, 2011).

A burgonya egyik legfontosabb kórokozója PVX vírus, mellyel szemben két extrém rezisztenciát biztosító gén már a fajtanemesítés szerves része. E két gén a Bendahmane és munkatársai (Bendahmane et al., 1999; Bendahmane et al., 2000) által klónozott *Rx1* és *Rx2*, melyek különböző *Solanum* fajok eltérő kromoszómáiból származnak. Ennek ellenére, a két gén nukleotid sorrendje 98%-os hasonlóságot mutat. E nagyfokú hasonlóság miatt

PCR alapú beazonosításuk és elkülönítésük hasonló génektől, mint például a *Gpa2* fonálféreg rezisztenciagén, vagy paralóg szekvenciáktól nehézségekbe ütközik. Általában véve, növény és vírus egymásra gyakorolt hatása a legkevésbé kutatott növény-patogén interakciók egyike. Ennek legkevésbé feltárt eleme épp az a vírus által a növényben kiváltott legkorábbi válaszreakció, aminek a rezisztencia kialakulásában kulcsszerepe van (Baebler et al., 2009). A rezisztens burgonyafajtában adott, teljes transzkriptóm profil megismerése elengedhetetlen a rezisztencia válaszban fő szerepet játszó gének beazonosításához. Számos kísérleti módszer fejlesztettek ki a vírusfertőzés következtében megváltozott transzkriptóm eltérések felfedésére. Közülük, a szupressziós szubtraktív hibridizáció (SSH), valamint legújabban az következő generációs szekvenálási technikák (NGS) nyertek teret a többi módszerrel szemben. Előbbi nagy hatékonysággal rendelkezik a különbözőképp kifejeződő gének cDNS alapú beazonosításában, és izolálásában, mivel az izolálás előzetes információ nélkül is lehetséges. Az NGS eljárás egyidejűleg teszi lehetővé százezres nagyságrendű DNS szekvencia bázissorrendjének meghatározását, drasztikusan lecsökkentve az eddig ehhez szükséges időt. Egy új, NGS alapú transzkriptóm elemzés, az RNS szekvenálás (RNA-Seq) segítségével nagy pontossággal határozható meg adott gének kifejeződésének mértéke, az RNS érési folyamatában lévő különbségek, valamint a transzkriptomok allél specifikus kifejeződése (Costa et al., 2010).

Növényekben, génspecifikus kodomináns markerek létrehozásának hatékony módszere az Intron-targeting (IT) (Seres et al., 2007) markerek fejlesztése. Más részről viszont a nagy hatékonyságú transzkriptóm szekvenálás előnye a keletkező nagy adatmennyiség nyújtotta lehetőség gének feltáráshoz és molekuláris markerek fejlesztéséhez.

2. KUTATÁSI CÉLOK

A kutatási program céljai a következők:

- 1) Magyar burgonyafajták PVX rezisztenciájának vizsgálata és a rezisztenciagén meghatározása molekuláris eszközökkel.
- 2) Az *Rx1* és *Rx2* PVX extrém rezisztencia génekre specifikus molekuláris markerek fejlesztése.
- 3) Az *Rx1* és *Rx2* gén egyetlen reakcióban történő detektálására egy multiplex PCR eljárás kifejlesztése, a marker alapú szelekcióban való alkalmazás céljából.

- 4) A PVX és PVY^{NTN} fertőzés korai stádiumában adott válasz vizsgálata PCR-szelektált szubtraktív hibridizáción alapuló részleges génkifejeződés vizsgálattal egy rezisztens burgonya fajtában.
- 5) Egy rezisztens burgonyafajta PVX, PVY^{NTN} és *Ph. infestans* fertőzésre adott génextpressziós változásainak teljes transzkriptom vizsgálata következő generációs szekvenálással (NGS).
- 6) NGS alapú intron-targeting markerek fejlesztése a burgonyában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Növényanyag

3.1.1. PVX fertőzési vizsgálatok

Vizsgálatunk során 16 magyar burgonya genotípus (1. táblázat) PVX vírusmentes mikro gumóját, valamint a Burgonyakutatási Központ (Pannon Egyetem, Keszthely) által előállított két keresztezési vonal F1 populációjának, a White Lady × Kuroda 75 és Luca XL × W1100 96 genotípusát használtuk, melyeket vektormentes környezetben, üvegházban neveltünk. Referencia növényként alkalmaztuk az ismert származással rendelkező Cara fajtát az *Rx1* gén és a Bzura fajtát az *Rx2* gén referenciájaként.

1. táblázat: Fajták és nemesítési vonalak

Fajta	Fajta	Nemesítési vonalak
Cara	Rioja	01.536
Bzura	Démon	06.62
White Lady	Góliát	06.256
Luca XL	Balatoni Rózsa	06.325
Lorett	Somogy Kifli	76.9104
Hópehely	Katica	W1100
Vénusz Gold		

3.1.2. Az *Rx1* és *Rx2* gén azonosítására fejlesztett markerek alkalmazhatóságának vizsgálata

A vizsgálatok során 48, eltérő genetikai háttérrel rendelkező kereskedelmi fajtát teszteltünk az általunk fejlesztett *Rx1* és *Rx2* gén specifikus primerekkel (2. táblázat).

2. táblázat: Az általunk fejlesztett primer párokkal (1Rx1; 5Rx1; 106Rx2) tesztelt burgonyafajták

Fajta	Származási ország	¹ PVX reakció	² Származás	Fajta	Származási ország	¹ PVX reakció	² Pedigré
Ditta	A	-	Ismeretlen	Premier	NL	-	CPC 1673-11
Laura	D	-	Ismeretlen	Santé	NL	-	CPC 1673-20
Romina	A	-	CPC 1673-20	Saturna	NL	S ^c	CPC 1673-1
Shepody	CDN	S ^a	Ismeretlen	Spunta	NL	-	Unknown
Raritan	CDN	-	Ismeretlen	Lady	NL	-	CPC 1673-20
				Rosetta			
Francelin	F	-	Ismeretlen	Amalia	NL	-	CPC 1673-11
Agria	D	-	Ismeretlen	Mondial	NL	R ^d	CPC 1673-20)
Bellarosa	D	S ^a	Ismeretlen	Courage	NL	-	CPC 1673-20
Bettina	D	-	Ismeretlen	Divina	NL	-	Cara
Franzi	D	-	Aquila	Raja	NL	-	CPC 1673-24)
Gala	D	-	Ismeretlen	Multa	NL	R ^c	CPC 1673-1
Natascha	D	-	Ismeretlen	Alcmaria	NL	R ^c	CPC 1673-20
Panda	D	-	Aquila	Amaryl	NL	R ^c	CPC 1673-20
Rosita	D	S ^b	Ismeretlen	Justa	PL	-	Unknown
Somogyi	H	-	Ismeretlen	Nativ	RO	-	Aquila
Sárga							
Somogyi	H	-	Ismeretlen	Kuba	PL	-	Bzura
Korai							
Sarolta	H	-	Aquila	Eridia	SK	-	Unknown
Agata	NL	-	Ismeretlen	Irati	E	-	CPC 1673-20
Asterix	NL	-	CPC 1673-20	Atlantic	USA	R ^d	CPC 1673
Ausonia	NL	-	CPC 1673-20	Kennebec	USA	-	Unknown
Carlita	NL	-	CPC 1673-11	Rhinered	USA	-	Unknown
Desiree	NL	S ^a	Ismeretlen	Russet	USA	-	Unknown
				Burbank			
Idol	NL	-	CPC 1673-11	Snowden	USA	-	Unknown
Mozart	NL	-	CPC 1673-1	Wauseon	USA	-	Unknown

1: Irodalmi adatok alapján

2: Feltételezett PVX rezisztencia a <http://www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree> alapján R: rezisztens; S: érzékeny; a: PRC-UP technikával vizsgált; b: irodalmi adat alapján (Bonierbale and F., 2007); c: irodalmi adat alapján (Roupe van der Voort et al., 1999); d: irodalmi adat alapján (Wilson and Jones, 1995). (A:Ausztria, CDN: Kanada, D:Németország, E: Spanyolország, F: Franciaország, H: Magyarország, NL: Hollandia, PL: Lengyelország, SK: Szlovákia, UK: Anglia, USA: Egyesült Államok)

3.1.3. Intron-targeting (IT) markerek fejlesztése

A burgonya következő generációs szekvenálással (NGS) kapott adatok alkalmazhatóságát IT markerek fejlesztésére a White Lady x S440 keresztezési vonal F1 populációjából származó 24 egyedden, illetve 24 eltérő származású fajtán vizsgáltuk (3. táblázat).

3. táblázat: Burgonya fajták és eredetük

Fajta	Származási ország	Fajta	Származási ország	Fajta	Származási ország
Ditta	A	Natasha	D	Santé	NL
Laura	D	White Lady	H	Desiree	NL
Shepody	CDN	Katica	H	Bzura	PL
Victoria	UK	Luca XL	H	Justa	PL
Franceline	F	Lorett	H	Irati	E
Gala	D	Démon	H	Eridia	SK
Rosita	D	Vénusz Gold	H	Kennebec	USA
Agria	D	Agata	NL	Snowden	USA

(A:Ausztria, CDN: Kanada, D:Németország, E: Spanyolország, F: Franciaország, H: Magyarország, NL: Hollandia, PL: Lengyelország, SK: Szlovákia, UK: Anglia, USA: Egyesült Államok)

Az általunk fejlesztett markerek alkalmazhatóságát *Solanum* fajokban, három vad *Solanum* populáción vizsgáltuk. A fajokat és a ploiditás fokát a 4. táblázatban tüntettük fel.

4. táblázat: A vizsgált *Solanum* fajok és ploiditásuk

<i>Solanum</i> ^a (populáció 1)	Ploiditás (2n)	<i>Archaeosolanum</i> ^a (populáció 2)	Ploiditás (2n) ^b	<i>Solanum</i> ^c (populáció 3)	Ploiditás (2n)
<i>S. scabrum</i>	6x = 72	<i>S. aviculare</i> var. <i>latifolium</i>	x = 46	<i>S. nigrum</i>	6x = 72
<i>S. chenopodioides</i>	2x = 24	<i>S. aviculare</i> var. <i>albiflorum</i>	x = 46		
<i>S. retroflexum</i>	4x = 48	<i>S. laciniatum</i>	x = 92		
<i>S. opacum</i>	6x = 72	<i>S. vescum</i>	x = 46		
<i>S. americanum</i>	2x = 24	<i>S. multivenosum</i>	x = 92		
<i>S. villosum</i>	4x = 48				

a: fajonként egy egyedtet vizsgáltunk ; b: az *Archaeosolanum* populáció tagjai rendellenes aneuploidiával rendelkeznek ; c: tizenegy egyedtet vizsgáltunk

3.2. DAS-ELISA teszt

A DAS-ELISA tesztek során Clark és Adams (Clark és Adams, 1977) módszerét alkalmaztuk poliklonális antitestek (Loewe Biochem, Németország) felhasználásával.

3.3. PVX rezisztencia tesztek

3.3.1. Mechanikai fertőzés

A burgonya növények negyedik és hatodik levélszint között található leveleit PVX vírussal fertőzött dohánylevélből készült szuszpenzióval fertőztük. A fajtákat és a nemesítési vonalakat öt ismétlésben, míg az F1 populáció egyedein három ismétlésben. Az oltás után négy héttel a vírusfertőzést DAS-ELISA teszttel vizsgáltuk.

3.3.2. Oltvány fertőzés

A nem fertőződött egyedeket (ELISA teszten negatív eredményt mutató, feltételezett PVX rezisztens) PVX donor paradicsom (Rutgers) oltvánnyal fertőztük újra. Minden feltételezett rezisztens genotípust háromszoros ismétlésben, reciprokoltással is teszteltünk. A fertőzés után négy héttel DAS-ELISA módszerrel vizsgáltuk az oltott növényeket.

3.4. Genomi DNS izolálás

A genomi DNS-t *in vitro*, tenyészedényes, valamint szabadföldi növények, 80 mg levél és szár szövetéből izoláltuk Walbot és Warren (1988) protokollja alapján.

3.5.PVX rezisztencia gén azonosítása

3.5.1. Marker analízis

Az *Rx1* gén vonatkozásában a következő CAPS markereket teszteltük: 77L (*AluI*), 77R (*HaeIII*), 221R, 218R (*AluI*), IPM3(*DdeI*), IPM4 (*TaqI*) (Kanyuka és mtsai., 1999); CP60 (*DdeI*), és GP34 (*TaqI*) (Bendahmane és mtsai., 1997). Az *Rx2* gén esetében pedig GP21 (*AluI*) és a TG432 (DeJong és mtsai., 1997) CAPS markerekkel végeztük el a PCR reakciót.

3.5.2. Rx génekre specifikus markerek fejlesztése

Az *Rx1* és *Rx2* specifikus primereket az adatbázisban (NCBI) található szekvenciák alapján (*Rx1*: AJ011801, *Rx2*: AJ249448) a Primer 3 program és az NCBI primer blast funkció alkalmazásával terveztük. A markerek alkalmazhatóságának vizsgálatához a PCR reakció során amplifikálódott fragmentumokat a pJET 1.2 klónozó kit-tel (CloneJET PCR Cloning kit, Fermentas, Litvánia) beklónoztuk, majd transzformáltuk. A transzformáláshoz DH5 α kompetens sejteket alkalmaztunk. A fragmentumok bázissorrendjét a 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, Egyesült Államok) szekvenáló készülékkel határoztuk meg, majd a MEGA5 szoftver (Tamura és mtsai., 2011) és a NCBI, BLASTN funkció segítségével elemeztük.

3.6. Rx gén kimutatására alkalmas multiplex PCR fejlesztése

Az *Rx1* és *Rx2* gének egyidejű kimutatására alkalmas multiplex PCR fejlesztéséhez azokat a primer párokat választottuk ki, amelyek külön-külön reakciókban is egyértelmű és méret szerint is jól elkülöníthető termékeket szaporítottak fel. A reakcióelegy optimalizálásához az egyes primerek koncentrációját 0.1 μM – 1.5 μM és a Dream Taq DNS polimeráz enzim mennyiségét 0.2 μl - 5 U μl^{-1} között teszteltük.

3.7. Transzkriptom analízis

A transzkriptom analízist a PVX, PVY és fitoftóra rezisztens White Lady burgonya fajtával végeztük el, három független kísérletben, háromszoros ismétlésben mintavételi időpontokként.

3.7.1. A kórokozókkal történő fertőzések

3.7.1. 1. Fertőzés PVX és PVY vírussal

A White Lady vírusmentes minigumóit vektormentes környezetben üvegházi körülmények között ültettük el. A négyhetes növények teljesen kifejlődött leveleit PVX (Ny), illetve PVY^{NTN} (D-10) vírust tartalmazó dohánylevél szuszpenzióval fertőztük, háromszoros ismétlésben. A kontroll növényt egészséges dohánylevélből készített oldattal kezeltük.

A mintavételezés a fertőzést követően 0, 5, 10 és 30 perc; 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 és 48 óra; 1 és 2 hét elteltével történt. A begyűjtött leveleket folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk és -70°C-on tároltuk az RNS tisztításig.

3.7.1.2. Fitoftórával történő fertőzés

A H12/10 fitoftóra (*Phytophthora infestans*) izolátumot az fogékony Hópehely fajta gumóján szaporítottuk fel, majd a sporangiumokat steril vízzel lemostuk és 1.5×10^4 spóra/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. A zoospórák indukálásához a szuszpenziót 4°C-on majd 2 óra 20 perc szobahőmérsékleten tároltuk. A fertőzés során 50 µl zoospóras szuszpenziót pipettáztunk a levelek fonákjára, majd a fertőzött leveleket műanyag páraaknába helyeztük és 16/8 világos/sötét, 21°C körülmények között inkubáltuk. A kontroll növény esetében kezelésként steril desztillált vizet használtunk. A mintavétel a fertőzést követően a 1, 4, 16, 24, 30, 48 és 72 órában illetve a 6. napon történt, a mintákat folyékony nitrogénnel fagyasztottuk le és -70°C-on tároltuk az mRNS kivonásig.

3.7.2. mRNS izolálás

Az mRNS kivonást RNazol@RT (MRC, Egyesült Államok) reagens protokollja alapján végeztük el. A mintákat az RNazol vizes oldatában homogenizáltuk, majd a DNS-t, a fehérjéket, poliszaharidokat és egyéb más molekulákat centrifugálás segítségével távolítottuk el. Ezt követően a tiszta

RNS-t, a felülészó rétegből történő alkoholos kicsapás után vizes visszaoldással nyertük ki.

3.7.3. mRNS előkészítése további vizsgálatokhoz

A PVX és PVY kísérleteknél az mRNS mintákat kétfelé vettük, az egyiket szubtraktív hibridizáláshoz a másik felét NGS transzkriptom elemzéshez használtuk. Az NGS szekvenáláshoz két mRNS mintát képeztünk, az egyik minta tartalmazta mindhárom fertőzési kísérlet kontroll mintáit, míg a másik a fertőzött minták mRNS-ét.

3.7.5. Szubtraktív hibridizáció

A cDNS szintézist, a kettős szálú cDNS szintézist, az Rsa I emésztést az adaptor ligálást, az első hibridizációt a második hibridizációt és a PCR reakciót, kisebb változtatásokkal a PCR-Select™ cDNA (PCR-select™ cDNA subtraction, Cat. No. 637401) protokollja alapján hajtottuk végre.

3.7.5.2. A cDNS klóntár létrehozása és tesztelése PCR technikával

Klónozáshoz a CloneJET™ PCR klónozó kit-et alkalmaztuk, majd a klónozott cDNS transzformálását Bioline (www.bioline.com) leírása alapján végeztük el. A transzformált fragmentumokat pJET (Fermentas, Litvánia) primerekkel, kolónia PCR-el teszteltük le.

3.7.5.3. cDNS klónok szekvenálása és szekvencia elemzése

A plazmid tisztítást a Gene Jet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Litvánia) leírása alapján hajtottuk végre, majd a szekvenálást a 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) szekvenáló készülék szabvány protokollja alapján végeztük. A fehérjéket kódoló géneket reprezentáló szekvenciákat (EST) a BLASTx funkció (E-érték $< 10^{-5}$, 2013 július) segítségével elemeztük, referencia szekvenciaként a SOL adatbázisban (E-érték $< 10^{-5}$, 2013 július) található *Phureja* csoport tagját a *S. tuberosum* DM1-3 5116R44 -t (továbbiakban burgonya-DM) választottuk.

3.7.6. NGS transzkriptom analízis

Az mRNS szekvenálást a szegedi BayGen Intézetben végezték a Life Tech SOLiD RNA Sequencing Kit (Life Technologies, USA) leírása alapján a

5500 XL SOLiD (life Technologies, USA) készülékekkel. A rossz minőségű és tört szekvenciákat kizártuk a vizsgálatból. A fennmaradó szekvenciákat kontigokba rendeztük, normalizáltuk, és a kópiaszám változás, valamint az ezer bázisonkénti leolvasások száma millió térképezett leolvasásonként (RPKM - number of reads per thousand bases per million mapped reads) (Mortazavi et al., 2008) értéket a CLC Genomics Workbench 4.8 (64 bit) szoftverrel elemeztük.

A transzkriptomok funkcionális azonosításához referencia szekvenciaként a SGN (SOL Genomics Network) adatbázisban elérhető Potato-DM összesen 39 031 fehérjét kódoló teljes genomi szekvenciáját használtuk.

3.8. Intron-targeting markerek fejlesztése az NGS adatok alapján

A transzkriptom adatokból a burgonya géneket az NCBI adatbázisban található burgonya genom szekvencia (E-érték 10^{-20} 2012. 06.) alapján a BLASTN funkció segítségével választottuk ki, majd a Sim4 (Florea és mtsai., 1998) program segítségével azonosítottuk a feltételezett intron régiókat.

Az intron targeting primereket az exon szekvencia és a feltételezett intron szekvencia alapján a PRIMER3 v. 0.4.0 szoftver (Rozen és Skaletsky, 2000) segítségével terveztük. A markerek alkalmazásával kapott mintázatot a fragmentumok megléte vagy hiánya szerint detektáltuk, majd a POPGENE version 1.31 (Yeh és mtsai., 1997) és az ATETRA v. 1.2 (Van Puyvelde mtsai., 2010) programok segítségével elemeztük. Az egyes polimorf intron markerek kromoszómán lévő helyzetének azonosításához az SGN (Solanum Genomics Network) (Mueller és mtsai., 2005) adatbázist használtuk.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) Megállapítottuk, hogy a magyar PVX rezisztens burgonyafajták az Rx2 gént tartalmazták. Egy specifikus primer párt fejlesztettünk ki az Rx2 azonosítására, és két specifikus primer párt a másik ismert PVX extrém rezisztenciagén, az Rx1 azonosítására. Továbbá, kifejlesztettünk egy multiplex PCR eljárást e két, nagyon hasonló szekvenciájú gén egyetlen reakcióban történő megkülönböztetésére.
- 2) Létrehoztunk egy, a White Lady fajtában PVX fertőzésre kifejeződő géneket tartalmazó cDNS klóntárat, és ebből 28 rezisztenciaválasz EST-t izoláltunk.
- 3) Létrehoztunk egy, a White Lady fajtában PVY^{NTN} fertőzésre kifejeződő géneket tartalmazó cDNS klóntárat, és ebből 35 rezisztenciaválasz EST-t izoláltunk.
- 4) Létrehoztunk egy NGS eljárással generált, PVX, PVY^{NTN} and *Ph. infestans* fertőzésen alapuló transzkriptóm adatbázist a White Lady fajtában. Az adatbázisból 748 transzkriptomot azonosítottunk, melyek csak a kezelt mintában fejeződtek ki, ami e gének rezisztencia válasz

specifikusságára enged következtetni. E gének 57%-a ismeretlen géneket vagy ismeretlen funkciójú konzervált géneket kódolt. A kezelt mintában 141 NBS-LRR típusú gént azonosítottunk, melyek közül 13 a Toll Interleukin-szerű receptor (TIR), és 50 pedig az ún. Coiled-coil (CC) típusba tartozott.

- 5) Kísérletesen igazoltuk az NGS eljárással generált transzkriptóm szekvenciákon alapuló és anker markerként alkalmazható, ún. intron-targeting markerek fejlesztésének hatékonyságát, valamint demonstráltuk e markerek más *Solanum* fajokban való alkalmazhatóságát.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- Baebler, S., Krecic-Stres, H., Rotter, A., Kogovsek, P., Cankar, K., Kok, E. J., Gruden, K., Kovac, M., Zel, J., Pompe-Novak, M., and Ravnikar, M. (2009). PVY^(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology* **10**, 263-75.
- Bendahmane, A., Baulcombe, D. C., and Kanyuka, K. (1999). The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-791.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. (1997). High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 153-162.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. (2000). *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *Plant Journal* **21**, 73-81.
- Bonierbale, M. W., Plaisted, R. L., and Tanksley, S. D. (1988). RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* **120**, 1095-1103.
- Bonierbale, S. H., and F., A. (2007). Procedures for standard evaluation trials of advanced potato clones, An International Cooperators' Guide. pp. 126. CIP.
- Clark, M. F., and Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475-483.
- Costa, V., Angelini, C., De Feis, I., and Ciccodicola, A. (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J Biomed Biotechnol* **853916**.

- DeJong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C., and Baulcombe, D. C. (1997). A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 246-252.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 14863-14868.
- Florea, L., Hartzell, G., Zhang, Z., Rubin, G. M., and Miller, W. (1998). A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Research* **8**, 967-974.
- Gebhardt, C., and Valkonen, J. P. T. (2001). Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 79-102.
- Hijmans, R. J., and Spooner, D. M. (2001). Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany* **88**, 2101-2112.
- Kang, M. S., and Priyadarshan, P. M. (2007). "breeding major food staples " First edition/Ed. Blackwell Publishing.
- Kanyuka, K. B., D. C. Bendahmane, A., van der Voort, J. N. A. M. R., and van der Vossen, E. A. G. (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 in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 679-689.
- Kole, C. (2007). "genome mapping and molecular breeding in plants," Springer.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* **5**, 621-628.
- Mueller, L. A., Solow, T. H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M. H., Ahrens, R., and Wang, Y. (2005). The SOL Genomics Network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology* **138**, 1310-1317.
- PGSC (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**, 189-194.
- Razdan, M. K., and Mattoo, A. K. (2005). "Genetic improvement of Solanaceous crops," Science Publishers.
- Ross, H. (1986). Potato breeding-problems and perspectives. *Advances in Plant Breeding. Suppl. 13. J. Plant Breed.* **Verlag. Paul Parey, Berlin.**
- Roupe van der Voort, J., Kanyuka, K., van der Vossen, E., Bendahmane, A., Mooijman, P., Klein-Lankhorst, R., Stiekema, W., Baulcombe, D., and Bakker, J. (1999). Tight 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* CPC1673 into cultivated potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 197-206.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In "Bioinformatics Methods and Protocols: Methods Molecular biology" (S. Krawetz and S. Misener, eds.), Vol. 132, pp. 365-386. Humana Press, Totowa.
- Salazar, L. (2003). Potato viruses after the XX century effects, dissemination and their control. *Material Participants in Pyongyang Intern. Scientific Simp. on Potato Pyongyang. DPRK. Pyongyang*, 35œ42.
- Saldanha, A. J. (2004). Java Treeview-extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246-3248.
- Seres, A., Deák, G., Tóth, G., Aubert, G., Burstin, J., Ellis, N., and Kiss, G. B. (2007). Comparative mapping. *The Medicago truncatula Handbook*.
- Storey, M. (2009). The harvested crop. *Potato biology and biotechnology. Advances and perspectives*, 441-470.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**, 2731-2739.
- Van Puyvelde, K., Van Geert, A., and Triest, L. (2010). ATETRA, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT. *Molecular Ecology Resources* **10**, 331-334.
- Walbot, V., and Warren, C. (1988). Regulation of Mu element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. *Molecular and General Genetics* **211**, 27-34.
- Wilson, C. R., and Jones, R. (1995). Occurrence of potato virus X strain group 1 in seed stocks of potato cultivars lacking resistance genes. *Annals of Applied Biology* **127**, 479-487.
- Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T. B., Ye, Z., and Mao, J. X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada* **10**.

6. PUBLIKÁCIÓS LISTA

A doktori értekezés témakörébe tartozó cikkek:

1. **Ahmadvand, R.**, Takács, A., Taller, J., Wolf, I., and Polgár, Z. (2012). Potato viruses and types of resistance to these viruses in potato. *Acta Agronomica Hungarica*, 60(3), 283-298.

2. **Ahmadvand, R.**, Wolf, I., Mousapour Gorji, A., Polgár, Z, and Taller, J. Development of molecular tools for distinguishing between the highly similar *Rx1* and *Rx2* PVX extreme resistance genes in tetraploid potato. *Potato Research*. (accepted)

3. **Ahmadvand, R.**, Poczai, P., Hajianfar, R., Mousapour Gorji, A., Polgár, Z, and Taller, J. Next generation sequencing based development of intron-targeting markers in tetraploid potato and their transferability to other *Solanum* species. *GENE* (accepted with revision)

A doktori értekezés témakörébe tartozó konferencia kivonatok:

1. **Ahmadvand, R.**, Hajianfar, R., Mousapour Gorji, A., El-Banna, A., Polgár, Z, and Taller, J. (2013). Development of intron-targeting markers as a tool for molecular breeding in response to pathogens. Proceeding of 8th plant breeding international conference, 6-7 May, Egypt.
2. **Ahmadvand, R.**, Taller, J., Wolf, I., and Polgár, Z. (2012). Identification of the resistance gene to PVX in Hungarian potato cultivars. 54 th Georgikon Scientific conference (Georgikon napok), October, 11-12.
3. **Ahmadvand, R.**, Hajianfar, R., Polgár, Z, and Taller, J. (2013). Transcriptome and functional marker study in potato. "Jövőnk" konferencia. TÁMOP-4.2.3-12/1/KONV-2012-0001. Keszthely, 2013. Május 15. Összefoglalók p:31.
4. **Ahmadvand, R.**, Hajianfar, R., Mousapour Gorji, A., Cernák, I, Polgár, Z, and Taller, J. (2013). Transcriptome analysis of White Lady in response to PVX, PVY and *Phytophthora infestans* using next generation sequencing. EAPR - EUCARPIA Congress "The challenges of improving both quality and resistance to biotic and abiotic stresses in potato", June 30 - July 04. 2013, Hévíz, Hungary. Pp: 26.
5. Elbana, A., **Ahmadvand, R.**, Hajianfar, R., Mousapour Gorji, A., Cernák, I, Polgár, Z, and Taller, J. (2013). Isolation and functional analysis of resistance response genes in potato and the development of molecular markers. EAPR - EUCARPIA Congress "The challenges of improving both quality and resistance to biotic and abiotic stresses in potato", June 30 - July 04. 2013, Hévíz, Hungary. Pp: 27.
6. Hajianfar, R., **Ahmadvand, R.**, Mousapour Gorji, A., Cernák, I, Polgár, Z, and Taller, J. (2013). Next generation sequencing based analysis of genes for resistance to *Phytophthora infestans* in cultivar White Lady.

- EAPR - EUCARPIA Congress "The challenges of improving both quality and resistance to biotic and abiotic stresses in potato", June 30 - July 04. 2013, Hévíz, Hungary. Pp: 26.
7. Hajianfar, R., **Ahmadvand, R.**, Polgár, Z., Wolf, I, and Taller, J. (2013) Allelic variation of the R1 late blight (*Phytophthora infestans*) resistance gene in White Lady variety. "Jövők" konferencia. TÁMOP-4.2.3-12/1/KONV-2012-0001. Keszthely, 2013. Május 15. Összefoglalók p:31.