

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

a

**Solanum stoloniferum alapú PVY immunitás gén
(Rysto) molekuláris genetikai vizsgálata**
című tematikus OTKA pályázatról

Nyilvántartási szám: TO37827

Keszthely

2002 - 2005.

Zárójelentés

Témavezető neve: Dr. Polgár Zsolt

A téma címe: *S. stoloniferum* alapú PVY immunitás gén (Rysto) molekuláris genetikai vizsgálata

A kutatás időtartama: 2002 - 2005

A kutatási program fő **célja** a keszthelyi burgonyafajtákra jellemző *S. stoloniferum* eredetű *Ry_{sto}* Y vírus immunitás génnel szorosan kapcsolt DNS markerek azonosítása, valamint az *Ry_{sto}* expresszióval kapcsolatba hozható cDNS-ek izolálása.

Növényanyag. A pályázati programot megelőző évek nemesítési tapasztalatai, a keresztezési populációk egyedeinek szántóföldi körülmények között megfigyelt PVY vírus rezisztencia hasadási arányai (természetes fertőzési forrás hatására bekövetkező fertőződés), valamint az ismert pedigre adatok alapján a saját nemesítésű White Lady burgonyafajtát választottuk ki a kísérletek alanyául, mint az Rysto rezisztenciagén hordozóját. A kísérletekben PVY vírussal szemben fogékony keresztezési partnerként való felhasználásra egy a White Lady –hez morfológiai bélyegek alapján rendkívül hasonló, de genetikailag tőle távol álló, az USA Wisconsin Egyetemének nemesítési programjából származó S 440 jelű burgonya vonalat választottuk ki.

A PVY immunitásért felelős gén kimutatására a White Lady fajtaival üvegházi körülmények között mesterséges fertőzési tesztek végeztünk. Először a burgonya Y vírus legagresszívabb NTN törzsének D10-es izolátumát dohány növényben felszaporítottuk és a növényeket mechanikailag inokuláltuk (foszfát puffer pH 7,0, karborundum por, üvegspatula) majd a fertőzést követő 4. héten DAS-ELISA módszerrel vizsgáltuk a vírus növényben való felszaporodását. Az immunitásért felelős gén jelenlétének további bizonyítására kertészeti oltást végeztünk (fertőzött paradicsom alanyra/burgonya oltóág, illetve burgonya alany/fertőzött paradicsom oltóág), majd az oltást követő 5. héten DAS-ELISA-val és bioteszttel (*S. demissum* A6 teszt) vizsgáltuk az alanyok és az oltóágak fertőzöttségét.

A kapott eredmények igazolták a White Lady fajta extrém rezisztenciáját a PVY^{NTN} törzssel szemben. Sem a mechanikai fertőzést és oltást követően, sem DAS-ELISA-val, sem bioteszttel nem sikerült a vírust a vizsgált növényekből kimutatni.

Az S 440-es vonal PVY-al szembeni fogékonyságát természetes fertőződést követően, a vírushatásra jellemző vizuális tünetek kiértékelésével, illetve a tüneteket mutató növények DAS-ELISA vizsgálatával bizonyítottuk. Az eredmények alapján az S 440 –es vonal rendkívül fogékony a PVY^{NTN} törzsével szemben, a jellegzetes tüneteket kiválóan mutatja, szöveiben a vírus gyors szaporodásra képes.

A PVY immunitás génre nézve hasadó tesztpopuláció előállítására érdekében a White Lady fajta és az S 440-es vonal 5-5 növényét üvegházi körülmények közé ültettük. Virágzáskor kárminecetsavas pollenfestéssel ellenőriztük mindkét genotípus hímivarú fertilitását. Ennek alapján a White Lady fajta a *S. stoloniferum*-ból származó citoplazma hatására jellemző tetrados hímsterilitást mutatott, míg az S 440-es vonal pollen-életképessége meghaladta a 90 % -ot. Így semmi akadálya nem volt a két vonal sikeres ivaros keresztezésének. Végül a White Lady fajta virágainak az S 440 vonal pollenjével való beporzásából a tenyészidőszak végére több mint 10 000 hibrid magot sikerült előállítani.

Rezisztencia vizsgálatok. Az F₁ magokat elvetve, több mint 200 növényt (vonalat) neveltünk fel üvegházi körülmények között. A felnevelt növények alól a gumókat

betakarítottuk, majd a gumókat a szükséges nyugalmi időszak letelte után elültettünk. Ezt követően a növényeket fertőzési teszteknek vetettünk alá. A fertőzési tesztek – a rendelkezésre álló gumószámtól függően - 3-5-szörös ismétlésben végeztük, a szülő vonaloknál leírtakkal azonos módon, a PVY^{NTN} törzsének dohányban fenntartott D₁₀-es izolátumával. A növényeket 4-6 leveles állapotban mechanikailag inokuláltuk (üvegspatula, karborundum por, foszfát puffer (pH 7,0)). A rezisztenciavizsgálatokat a fertőzés utáni 4., 5. és a 6. héten végeztük. A vírus jelenlétére utaló sárga színreakció intenzitását fotométerrel (EPD-1) mértük. A fertőzési vizsgálatok során 195 F₁ vonalat értékeltünk ki. Először a szisztemikus mozaikos tünetek alapján vizuálisan különítettük el a fogékony és rezisztens vonalakat, majd az osztályozást ELISA vizsgálattal ellenőriztük. A tünetet mutató növények mindegyike pozitív reakciót adott a DAS –ELISA vizsgálatban. A DAS-ELISA tesztet (Clark és Adams 1977) a Loewe Biochemica GmbH kitjével háromszori ismétlésben végeztük. A vizsgálatok eredményeként 95 rezisztens és 100 fogékony vonalat különítettünk el, amely 1:1 hasadási aránynak felel meg ($\chi^2 = 0,082$; $0,70 < P < 0,90$). Ez az eredmény alátámasztja a korábbi feltételezést, hogy a gén egy kópiában van jelen a rezisztens szülőben.

A növényanyag fenntartása. A rezisztencia vizsgálatokkal párhuzamosan az összesen vonalból steril in vitro tenyészetet alakítottunk ki, abból a megfontolásból, hogy a későbbiekben bármilyen jellegű vizsgálathoz elegendő növényanyag álljon rendelkezésünkre. Ehhez minden vonalból rügyeket sterilizáltunk, majd MS táptalajra helyezve 4-6 hetenkénti passzálassal tartottuk fenn őket.

Marker detektálás. A markerfejlesztést kétféle módszerrel, az AFLP-vel és az RAPD-vel kezdtük meg.

AFLP: Az AFLP vizsgálatokat a Gibco BRL, majd az Invitrogén kitjével is elvégeztük az *MseI/EcoRI* enzimpárt használva. A szülő vonalak mellett 12-12 rezisztens és fogékony vonalat vizsgáltunk a kitben szereplő 8-8 primerrel. A detektálást 6%-os akrilamid gélen való szétválasztás után ezüstoffestéssel végeztük. A vizsgálatoknak ez a rendkívül munkaigényes módja, valamint a teljes populációra kalkulált magas költségek miatt döntöttünk úgy, hogy a markerfejlesztéshez inkább az csak RAPD módszert alkalmazzuk.

RAPD: Tíz-tíz véletlenszerűen kiválasztott fogékony illetve rezisztens egyedből kevert (bulk) DNS-t tisztítottunk, és 10-mer primerekkel, valamint 12-mer primerpárokkal megkezdjük a minták PCR alapú összehasonlító vizsgálatát. Egyidejűleg 3-3 bulkot hasonlítottunk össze. Mintegy 50 féle 10-mer primert és több mint 1.000 féle 12-mer primerkombinációt használtunk, és ezekkel több mint 100 darab, csak a rezisztens bulkban jelenlévő, jól elkülöníthető, éles mintázatot detektáltunk. Azonban a bulkok egyedeit külön-külön vizsgálva, nem találtunk a rezisztenciagénhez szorosan kapcsolt polimorf mintázatot. Ennek oka az egyes vonalak közötti nagyfokú polimorfizmus volt, mely a bulkokban „téves” jeleket mutatott. Ezért a továbbiakban a polimorfizmusokat jobban lefedő, nagyobb egyedszámú, - 25-25 egyedből álló – bulkokban folytattuk a vizsgálatot. Több mint 3.000 primerkombinációval több mint 30.000 jól értékelhető sávot vizsgáltunk, melyekből mintegy 100 volt polimorf. A polimorf fragmentumok közül számos mutatott kapcsoltságot az *Ry_{sto}* génnel. A két legszorosabb kapcsoltságot mutató marker esetében mindössze 1 rekombinációs eseményt detektáltunk. Mindkét esetben ugyanannál az egyednél detektáltuk a rekombinációt. A detektált markerek mind a *Ry_{sto}* gén egyik oldalán helyezkednek el, amiből arra következtettünk, hogy maga a gén a kromoszóma disztális végére lokalizálódik.

Markerek megbízhatóságának vizsgálata. A 4 legszorosabban kapcsolt markert három további F₁ családban teszteltük. Ennek alapján a 2196 jelű markerünk mutatkozott a legszorosabban kapcsoltnak a *Ry_{sto}* génnel, míg a többi marker cM-ban kifejezett távolsága gyakorlatilag nem változott.

Szekvencia analízis. A *Ry_{sto}* génnel legszorosabban kapcsolt 4 markert szekvenáltattuk, és homológia keresést végeztünk az adatbázisokban. A *Ry_{sto}* génnel

legszorosabban kapcsolt markerünk egy paradicsom 12-es kromoszóma szekvenciával mutatott nagyfokú homológiát, míg a másik három markerünk a burgonya V-ös kromoszómáján mutatott szintén magas homológiát. Ez azért is meglepő, mivel az eddig publikált adatok nem teljesen egyértelműek a gén térképpozíciójára vonatkozólag. Brigneti és mtsai (1997) a XI-es kromoszómára, míg Flis és mtsai (2005) a XII-es kromoszómára térképezték a *Ry_{sto}* gént. Song és mtsai (2005) szintén a XII-es kromoszómára lokalizálták, azonban nem találtak kapcsoltságot saját markereik és Flisék markerei között. A White Lady fajta a PVY mellett PVX rezisztenciával is bír, és a burgonyából eddig két PVX rezisztenciagént (*Rx* és *Rx2*) izoláltak a XII-es és az V-ös kromoszómáról. Ezért úgy gondoltuk, hogy e két *Rx* gén vizsgálata segítségünkre lehet *Ry_{sto}* gént tartalmazó kromoszóma meghatározásában. Az V-ös kromoszómán található *Rx2* nyílt leolvasási keretére (ORF) specifikus primerpárokkal 1:1 arányban hasadó terméket kaptunk, azonban ez nem mutatkozott kapcsoltnak a *Ry_{sto}* génnel. A XII-es kromoszómán elhelyezkedő *Rx* gén specifikus primerpárjaival kapott termék és az *Ry_{sto}* gén között egy lazább kapcsoltságot találtunk. Ez megfelel a térképadatoknak, hogy a két gén a XII-es kromoszóma ellentétes végein helyezkedik el.

Publikált markerek tesztelése. A fent hivatkozott három publikációban közölt markereket leteszteltük a saját vizsgálati anyagunkon is.

Brigneti és mtsai (1997) által közölt, a XI-es kromoszómára lokalizálódó, az *Ry_{sto}* génnel hasadás nélkül öröklődő 3 db. AFLP marker többszöri ismétlés után sem volt kimutatható a vizsgálati anyagunkban. Ehhez a publikációban leírtaknak megfelelően *MseI/PstI* emésztett fragmentumokat szelektáltunk a megadott primerpárokkal. Itt a White Ladyben detektált polimorf fragmentumok nem mutattak kapcsoltságot a *Ry_{sto}* génnel.

Flis és mtsai (2005) a XII-es kromoszómára fejlesztettek ki egy STS és 3 CAPS markert. Az 1,2 cM-ra lokalizált STS marker a markerezési populációnkban ugyan mutatott polimorfizmust, azonban nem találtuk kapcsoltnak a *Ry_{sto}* génnel, míg a távolabb elhelyezkedő CAPS markerek egyáltalán nem voltak polimorfak. A szerzőkkel kapcsolatba lépve, a publikáltak helyett egy további CAPS markert ajánlottak, azonban ez sem hasadt a mi populációnkban. Song ugyanilyen eredményről tájékoztatott minket a saját populációjában a Flisék által fejlesztett markerekre vonatkozólag.

Heldák és munkatársai (2005), bár nem határozták meg a *Ry_{sto}* gén térképi helyét, azonban publikáltak kapcsolt IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) és REMAP (Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) markereket. A White Ladyben valóban kimutathatók voltak ezek a markerek, azonban nem mutattak kapcsoltságot a *Ry_{sto}* génnel.

Song és mtsai (2005) Flisékhez hasonlóan a XII-es kromoszómára lokalizálták a *Ry_{sto}* gént egy 111 bp méretű STM0003 jelű, Milbourne és mtsai (1998) által leírt SSR markeren keresztül. Az STM0003 marker a vizsgálati anyagunkban 1,8 cM-ra térképeződött a *Ry_{sto}* géntől. Minden vizsgált populációnkban szorosan kapcsolt volt, és saját markeinkhez képest a gén túloldalán helyezkedik el.

Specifikus primerpárok fejlesztése. A nukleotid sorrend alapján markereinkre a RAPD primerek helyett szekvencia-specifikus primerpárokat terveztünk. Ezek burgonyanemesítési alkalmazását a 2006-os év tavaszán kezdjük meg a Burgonyakutatási Központ nemesítési anyagán.

RNS alapú vizsgálatok. Az *Ry_{sto}* gént hordozó White Lady fajtát a rezisztencia vizsgálatokban leírtak szerint fertőztük, majd ½, 1, 2, 6, 12 és 24 órás időközökkel a fertőzött növényekről, valamint a kontrolról levélmintát szedtünk, majd RNS-t tisztítottunk (TRIZOL, Gibco BRL), és elvégeztük a cDNS szintetizálást (Revert Aid, Fermentas). A jó minőségű RNS ellenére vizsgálatainknak ebben a részében egy másfajta eljárás mutatkozik szükségesnek a first strand szintézishez és az azt követő lépésekhez.

Markerezési vizsgálataink eredményeiről (4 detektált marker) a Molecular Breeding szaklapban való megjelenésre készítettünk elő egy kéziratot. Ezt azonban a kéziratunk elkészültekor megjelent, - és előbbiekben referált – publikációkra vonatkozó vizsgálataink eredményeivel elküldés előtt még ki kell egészítenünk.

Az elvégzett kutatási munka jelentősége. A burgonya legveszélyesebb vírus kórokozójával, a PVY vírussal szemben extrém rezisztenciát biztosító *Ry_{sto}* génnel szorosan kapcsolt markereket fejlesztettünk. Markereink közvetlen gyakorlati alkalmazást tesznek lehetővé, amitől a burgonya rezisztencianemesítés - PVY rezisztenciára vonatkozó - felgyorsítását, és ezáltal a hazai burgonyanemesítés piaci versenyképességének erősödését várjuk.

Mint a referált publikációkból is látható a *Ry_{sto}* gén pontos térképi helyének megállapítása nehézségekbe ütközik, és a szakterület specialistái között továbbra is különböző nézetek állnak fenn a lókuszok számát, és az alléleket illetően. Ezért eredményeink alapkutatási szempontból mindenképpen tudományos érdeklődésre tartanak számot. Mivel egyik markerünk az eddig publikált markerek közül a génnel a legszorosabban kapcsolt (0,7cM), ezért egyúttal viszonyítási pont is lehet a *Ry_{sto}* gén esetleges térkép alapú klónozásában.