

„A burgonya -y vírus gumó nekrotikus gyűrűsfoltosság törzsével (PVY^{NTN}) szemben extrém rezisztenciát (immunitást) biztosító gének vizsgálata vad *Solanum* fajokban hagyományos és molekuláris módszerekkel”

OTKA kutatás (T042668) részletes szakmai zárójelentése

1. A kutatások témája, résztvevői:

A kutatási program során a burgonyatermesztésben a legnagyobb károkat okozó és a jelenlegi fajták rezisztenciáját áttörő (Beczner et al., 1984) burgonya Y vírus gumó nekrotikus gyűrűsfoltosság törzsével (PVY^{NTN}) extrém rezisztenciát (immunitást) mutató burgonyafajták előállításához szükséges vad rezisztenciaforrások virológiai jellemzését és molekuláris vizsgálatát végeztük el a Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Karán (PE GMK), több szervezeti egységben dolgozó oktatók-kutatók részvételével (Növénytudományi és Biotechnológia Tanszék: Dr. Alföldi Zoltán, Biotechnológiai Kutatócsoport: Dr. Taller János, Burgonyakutatói Központ: Dr. Polgár Zsolt és Wolf István, Növénykórtani és Virológiai Tanszék: Prof. Dr. Gáborjányi Richard és Prof. Dr. Horváth József, valamint MTA Növényvirológiai Kutatócsoport: Dr. Takács András Péter). A kutatásokban dél-amerikai rövidnappalos gumóképző vad *Solanum* fajokat és származékokat (*S. acroscopicum*, *S. albornosii*, *S. arnesii*, *S. ambosinum*, *S. tarnii*) vizsgáltunk.

2. A kutatások előzményei:

Az intézményünkben több évtizedes hagyományokkal rendelkező burgonyanemesítési programok hatékonyságának növeléséhez az elmúlt években több OTKA kutatási programban folytattunk vad *Solanum* fajokkal virológiai (OTKA T34317, témavezető: Dr. Horváth József) és molekuláris kutatásokat (OTKA T37827, témavezető: Dr. Polgár Zsolt) a burgonya Y vírus (PVY) rezisztenciaforrások és rezisztenciagének jellemzésére. Ezekben a korábbi kutatásokban néhány vad *Solanum* faj (*S. hougasii*, *S. tarnii*, *S. stoloniferum*) különböző genotípusait vizsgáltuk. A jelen kutatási munkák során újabb vad *Solanum* fajok (*S. acroscopicum*, *S. albornosii*, *S. arnesii*, *S. ambosinum*, *S. tarnii*) genotípusainak virológiai és molekuláris jellemzését tűztük ki célul korszerű vizsgálati módszerekkel, a nemesítési programokban történő felhasználás céljával.

Mindezek a vizsgálatok azt a célt szolgálják, hogy a vad *Solanum* fajokban meghatározzuk a PVY extrém ellenállóság génjeit, azokhoz kapcsolt markerek kifejlesztésével lehetőséget kapjunk rezisztens vad fajok molekuláris módszerekkel történő kiválasztására és nemesítési célú felhasználására. A markerek kifejlesztése – kapcsolódva más nemesítési programokkal - lehetőséget ad a vizsgált *Solanum stoloniferum* genotípusok rezisztencia markereinek összehasonlítására is.

3. A kutatások rövid bemutatása:

3.1. Vírusfertőzési vizsgálatok

A kutatások első éveiben (2003-2004) az Egyesült Államok Surgeon Bay-i Burgonya-Génbankjából kaptunk magokat a vizsgálatokba bevont vad *Solanum* fajokból. A fajok (*S. tarnii*, *S. acroscopicum*, *S. ambosinum*, *S. albornosii*, *S. arnesii*) 9 származékának (PI 545846, PI 498046, PI 230495, PI 498048, PI 365316, PI 543849, PI 545880, PI 568916, PI 545958) magvainak MS táptalajon kapott csírázási erélye azonban - 10 %-os Na-hypoklorit oldattal történt fertőtlenítés és erős gibberellin kezelés (100mg/l GA₃) ellenére is olyan alacsony volt,

hogy alig 5%-uk hajtott ki. A kicsírázott növényeket táptalajon felneveltük, majd egyedenként a genotípusokat *in vitro* felszaporítottuk (klónoztuk). Az előállított 45 klón felszaporított növényeit 2004-ben vektormentes üvegházba kiültettük és 4-6 leveles korban a burgonya Y Potyvirus (PVY) NTN törzsének D10 izolátumával fertőztük (karborundum-por/üvegspatula/foszfát puffer pH 7,0). A klónok valamennyi növényegyedének PVY-fertőzöttségét DAS-ELISA módszerrel (Loewe Biochemica GmbH poliklonális antitest, foszfatáz enzim-antitest konjugátum, pNPP szubsztrát, A=405nm) vizsgáltuk. Elkülönítettük a PVY^{NTN} törzssel szemben rezisztens és fogékony növényeket, hasadó populáció létrehozása céljából (1. táblázat).

A vizsgálatok során a *S. arnesii* 3 származékának (PI 545846, PI 545880, PI 545958) 10 klónja (fertőzött/inokulált növények klónonként: 8/8, 8/8, 8/8, 8/8, 8/8, 8/8, 8/8, 8/8, 6/6, 10/10, 8/8), a *S. acroscopicum* 2 származékának (PI 230495, PI 365316) 15 klónja (8/8, 7/8, 8/8, 5/6, 5/7, 6/6, 6/7, 6/7, 2/4, 4/4, 4/4, 3/3, 2/2, 6/6, 8/8) bizonyult fogékonyak.

A *S. tarnii* 1 származékának (PI 498046) 9 klónja (0/8, 0/8, 0/5, 0/4, 0/7, 0/8, 0/7, + 0/7, 0/7) rezisztensnek, 1 származékának (PI 498048) 4 klónja (1/9, 1/8, 8/8, 1/9) fogékonyak, 5 klónja (0/9, 0/9, 0/7, 0/7, 0/7) rezisztensnek bizonyult. A további vizsgálatokból a *S. tarnii* faj PI 498048 származékát kizártuk, mert a rezisztencia megnyilvánulását valószínűleg valamilyen módosító gén befolyásolhatta.

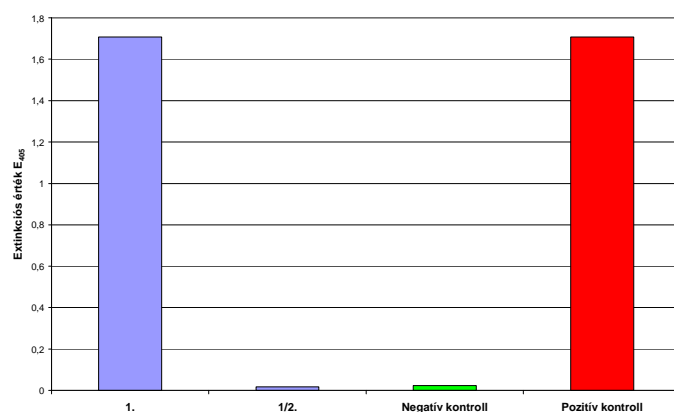
A *S. ambosinum* egy származékának (PI 568916) vizsgált két klónja közül 1 rezisztens (0/8 fertőzött/inokulált növény, 1. kép és 1. ábra), 1 pedig fogékony (8/8 fertőzött/inokulált növény) volt (1. ábra).

A rezisztencia-vizsgálatok alapján 3 csoportot alakítottunk ki:

1. Azok a fajok, amelyeknek valamennyi klónja fogékony (*S. arnesii*, *S. acroscopicum*).
2. A *S. tarnii* PI 498046 származéka, amelynek valamennyi klónja rezisztens.
3. A *S. ambosinum* PI 568916 származéka, amelynél fogékony és rezisztens klónt egyaránt találtunk.



1. kép. *S. ambosinum* rezisztens vonal 2 héttel PVY^{NTN} fertőzés után.



1. ábra. *Solanum ambosinum* faj (PI 568916) két vonalának eltérő fogékonysága mechanikai fertőzés után.

1. táblázat: Vad Solanum fajok burgonya Y-vírus (PVY^{NTN}) fogékonysága.

PI szám	Faj	Vonal	Fertőzött/vizsgált növény	Átlagos extinkciós érték		
PI 545846	Solanum arnesii	2	8/8	1,663		
		3	8/8	1,661		
		4	8/8	1,477		
		5	8/8	1,284		
		6	8/8	1,555		
		7	8/8	1,312		
		8	8/8	1,437		
		9	6/6	1,32		
		PI498086	S. tarnii	1	0/8	0,054
2	0/8			0,054		
3	0/5			0,039		
5	0/4			0,043		
6	0/7			0,023		
7	0/8			0,02		
9	0/7			0,0179		
10	0/7			0,018		
PI 230495	S. acroscopicum			1	8/8	0,849
				2	7/8	0,836
		3	8/8	1,389		
		4	5/6	1,11		
		5	5/7	1,22		
		6	6/6	1,156		
		7	6/7	1,448		
		8	6/7	1,586		
		9	2/4	0,874		
		10	4/4	1,4		
PI 498048	S. tarnii	1	0/9	0,024		
		2	0/9	0,021		
		3	1/9	0,055		
		4	0/7	0,03		
		5	0/7	0,018		
		6	0/7	0,024		
		7	1/8	0,163		
		8	8/8	1,681		
		9	1/9	0,206		
PI 365316	S. ambosinum	1	4/4	1,681		
		2	3/3	1,681		
		3	2/2	1,681		
		4	6/6	1,681		
PI 543849	S. albornosii	1	8/8	1,633		
PI 545880	S. arnesii	15	10/10	1,564		
PI 498046	S. tarnii	19	0/7	0,023		
PI 568916	S. ambosinum	1	8/8	1,707		
		1/2	0/8	0,017		
PI 545958	S. arnesii	14	8/8	1,61		

2003-2004. években – az alacsony csírázási erély miatt - 3 különböző alkalommal kértünk és kaptunk magokat az Egyesült Államokból, a Surgeon Bay-i Burgonya Génbankból. A vizsgált vad *Solanum* fajokból 2004. és 2005. években keresztezéseket végeztünk minden lehetséges kombinációban hasadó populációk létrehozása céljából, valamennyi faj és származék egyedei között. Emellett egy diploid *S. tuberosum* fajhibrid burgonyával történt keresztezést is megkíséreltünk; valamint kísérleteket tettünk a fajon belüli öntermékenyítésekre is. A csírázási nehézségek után a keresztezések és öntermékenyítések minden esetben sikertelenek voltak. A sikertelenség legvalószínűbb okának a vad fajoknak az általunk biztosítani tudottól jelentősen eltérő ökológiai igényét tartottuk, ezért a továbbiakban az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetében, Martonvásáron (*Dr. Galiba Gábor* osztályvezető szívességéből) klímakamrai körülmények között neveltünk fel növényegyedeket a további keresztezésekhez és a vizsgálatokhoz. Sikeres keresztezést azonban az így felnevelt növényekkel, többszöri próbálkozás után sem sikerült elérnünk.

3.2. Szomatikus *Solanum* hibridek előállítása

A pályázatban szereplő vad burgonyafajokban meglévő burgonya Y rezisztenciagének közül előzetes információink alapján a *S. tarnii* fajban lévő gént tartottuk a legígéretesebbnek. A faj PI 498046 azonosító számú család egyedeinek jellemzésekor előzetes reményeink be is igazolódtak. A mesterséges fertőzést követő DAS-ELISA vizsgálatok eredménye alapján a megvizsgált egyedek mindegyike immunisnak bizonyult a PVY legagresszívabb NTN törzsével szemben is (1. táblázat). Mivel vírus fogékony egyed a családban azonban nem tudtunk találni, ezért a fajon belüli, géntérképezésre alkalmas, hasadó populáció előállítására nem volt lehetőségünk.

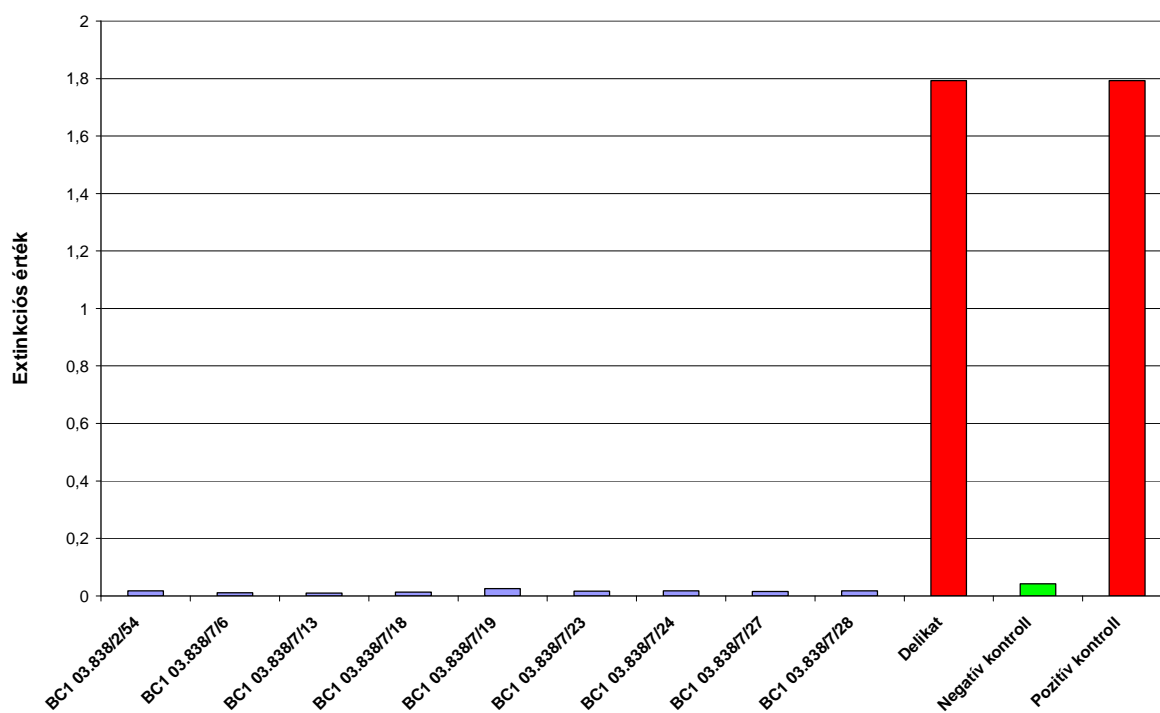
2005-2006. években intenzív keresztezési munkát végeztünk annak érdekében, hogy olyan 4x, vagy 2x, a PVY-al szemben fogékony burgonya (*S. tuberosum*) genotípusokat találjunk, melyekkel a *S. tarnii* keresztezhető. Munkánk azonban a legnagyobb erőfeszítések ellenére sem vezetett eredményre. Mivel a PVY rezisztenciagénre nézve hasadó populációt nem tudtunk előállítani, ezért egy alternatív megoldást választottunk. A Burgonyakutatói Központ, és a németországi Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants (BAZ), Institute of Agricultural Crops, Gross Luesewitz között meglévő, több évtizedre visszatekintő nemesítői együttműködés keretében hozzájutottunk olyan szomatikus hibridekhez melyeket a *Solanum tarnii* és a Delikat nevű német burgonyafajta protoplasztfúziója révén állítottak elő. Jelen pályázathoz kapcsolódóan 4 szomatikus hibridet és a Delikat fajtával való visszakeresztezésből származó 11 BC₁ vonalat kaptunk a német féltől kísérleti célokra. Az *in vitro* palántaként kapott vonalakat először felszaporítottuk, majd gumónyerés céljából üvegházba kiültettük.

Minden vonallal üvegházi és szabadföldi kísérletet is beállítottunk a PVY-al szembeni rezisztenciaviszonyok ellenőrzése érdekében. Az eredeti *S. tarnii* fajjal végzett mesterséges vírusfertőzésen alapuló kísérlettel teljesen megegyező tesztben vizsgáltuk a vonalak vírusrezisztenciáját a PVY normál (o) és gumónekrózist okozó (NTN) törzsével szemben. A párhuzamosan végzett szabadföldi tesztben a természetes körülmények közötti vírusrezisztenciát vizsgáltuk.

Mindkét vizsgálati módszer igazolta a *S. tarnii* fajban meglévő rezisztenciagén stabilitását. Sajnos azonban ismét egyetlen fogékony egyed sem azonosítottunk (2. táblázat és 2. ábra; a német fél előzetesen szelektálta a vonalakat az "o" törzzsel szemben). A Delikat fajtával való sikeres visszakeresztezés, és a rezisztenciagén stabil öröklődése mindazonáltal előrevetíti annak a lehetőségét, hogy ezeket a vonalakat használva, a pályázati munka folytatásaként sikerülhet előállítani egy olyan hasadó populációt, mely a sikeres géntérképezési munka alapját képezheti.

2. táblázat: *Solanum tarnii* + *Solanum tuberosum* Delikat szomatikus hibridek BC1 generációjának PVY^{NTN}-rezisztenciája.

Genotípus	Státusz	PVY ^{NTN}	
		Fertőzött/vizsgált növény	Átlagos extinkciós érték
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/2/54	0/10	0,017
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/6	0/10	0,011
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/13	0/10	0,01
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/18	0/10	0,013
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/19	0/2	0,025
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/23	0/5	0,016
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/24	0/10	0,018
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/27	0/10	0,015
Delikat (+) trn x Delikat	BC1 03.838/7/28	0/10	0,017
Delikat	Fúziós partner	10/10	1,793
Pozitív kontroll			1,793
Negatív kontroll			0,042



2. ábra: *Solanum tarnii* + Delikat szomatikus hibridek BC1 generációjának PVY^{NTN} vírusrezisztenciája

3.3. DNS-szintű vizsgálatok: molekuláris markerezés

A különböző vad *Solanum* fajok molekuláris összehasonlító vizsgálatára a RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) módszert alkalmaztuk. Az azonos vonalakhoz tartozó egyedekről begyűjtött fiatal levélmintákból a Walbot és Warren (1988) által használt, módosított eljárással tisztítottunk DNS-t. A vizsgálatokban 14 primérpárt és 2 db *Solanum andigena* és *Solanum chacoense* fajokból származó burgonya Y vírus extrém rezisztenciagénre specifikus priméreket használtunk. A RAPD vizsgálatokban használt primerpárok szekvenciája:

96+7: 5' – GGA ATT CGT GTC TAG – 3' + 5' – GGA TGA GAC CGG – 3'

96+13: 5' – GGA ATT CGT GTC TAG – 3' + 5' – GAA TGC GAC CAA – 3'

A RAPD markerek alkalmazásával a vizsgált *Solanum* fajok között genetikai különbséget nem tudtunk kimutatni. A *S. ambosinum* PI 568916 származékának fogékony és rezisztens klónjainak RAPD markerekkel történő összehasonlító vizsgálata az egyes reakciókban kapott nagyszámú polimorfizmus és a kevés egyedszám miatt nem bizonyult alkalmasnak egy markerezési program lefolytatásához.

A nemesítők által jelenleg használt nemesítési vonalak vad burgonyafajokból származó rezisztenciagéneket tartalmaznak. E gének beépítése általában hosszú évtizedekkel ezelőtt, különböző intézetekben történt, és a vonalak pedigree-jéről nincsenek egyértelmű feljegyzések. Ezért indokoltnak tűnt, hogy a három különböző vad fajból (*S. andigena*, *S. stoloniferum* és *S. chacoense*) származó PVY rezisztenciagén ismert markereit az általunk vizsgált vad fajokon, illetve származékaikon leteszteljük. Ezért 2005-ben a vizsgált vad burgonyafajokkal további molekuláris markerezési vizsgálatokat végeztünk. A vad fajok növényein a szakirodalomból ismert alábbi markereket teszteltük:

- *Solanum chacoense* Ry marker: CHA38 (Hosaka et al. 2001) RAPD marker,
- *Solanum tuberosum* subs. *andigena* Ry marker: RYSC3 (Kasai et al. 2000) SCAR marker,
- *Solanum stoloniferum* Ry marker: GP 81 és GP122 (Flis et al. 2005) SCAR, ill. STS marker,
- *Solanum stoloniferum* Ry marker: RLTR1-MS15 és RLTR3R-MS15 (Heldák et al. 2005) retrotranszpozon - mikroszatellit markerek, és
- *Solanum stoloniferum* Ry marker: SM0003 (Milbourne et al. 1998) STS marker.

A markerezési munkák mellett markerfejlesztést is folytattunk: a pályázatban szereplő vad burgonyafajokon teszteltünk 4db saját fejlesztésű, az Ry géntől 0,5-6,7 cM távolságra térképeződő *Solanum stoloniferum* Ry markert is.

Eredményeink minden esetben negatívak voltak, azaz a vizsgált PVY rezisztencia markerekkel nem sikerült a kívánt méretű fragmentumot detektálni, annak ellenére, hogy mindegyikkel több PCR terméket kaptunk. Ez felveti annak lehetőségét, hogy növényanyagunk esetlegesen más Ry rezisztenciagént tartalmaz. Ennek lehetőségét a PVY rezisztencia gének korábbiakban közölt eltérő lokalizációja (*S. andigena*: XI. kromoszómán, *S. stoloniferum*: XII. kromoszómán, míg *S. chacoense*: IX. kromoszómán) is alátámaszthatja. A PVY elleni extrém rezisztencia géneket ismereteink szerint eddig még nem klónoztak.

3.4. Filogenetikai vizsgálatok

Az RAPD mintázatokból kapott bináris adatokból egy távolság mátrixot hoztunk létre. A mátrix megalkotásához és az értékelésekhez a TREECON v.1.3b (Van de Peer és Wachter, 1994) programot használtunk. A genetikai távolságok számításához két módszert alkalmaztunk az eredmények összehasonlíthatósága miatt. Az egyik módszer Nei és Li (1979) genetikai hasonlósági indexe:

$$GD_{xy} = 1 - \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y}$$

ahol N_{xy} a mindkét típusú mintázatban megtalálható fragmentumok száma,

$N_x + N_y$ pedig az egyes típusokban megtalálható fragmentumok számának az összege.

A másik módszer számításait Link és munkatársai (1995) képlete alapján végeztük el:

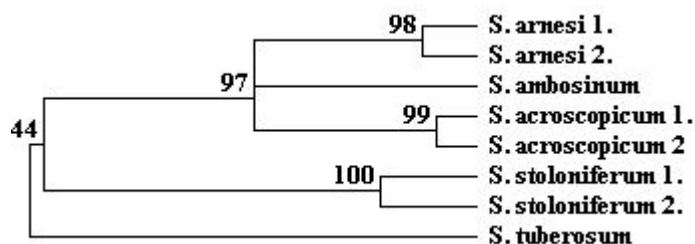
$$GD_{xy} = \frac{N_x + N_y}{N_x + N_y + N_{xy}}$$

ahol N_x azoknak a fragmentumoknak a száma, amelyek megtalálhatóak x-ben, de y-ban nem

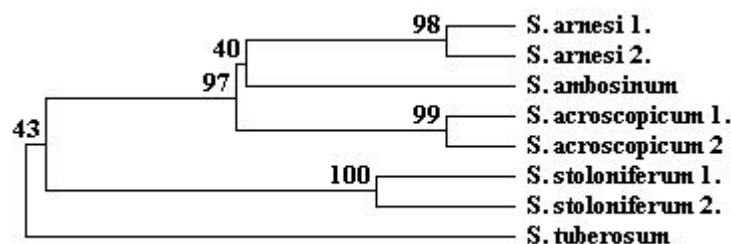
N_y azoknak a fragmentumoknak a száma, amelyek megtalálhatóak y-ban, de x-ben nem

N_{xy} pedig x-ben és y-ban is megtalálható fragmentumok száma.

A távolsági mátrix csoportosításához a hierarchikus osztályozás egy általánosan alkalmazott agglomeratív módszerét, az UPGMA (távolságokat optimalizáló csoportátlag) klaszterezési eljárást, a megbízhatóság vizsgálatához pedig a „bootstrap (visszatevéses minta) analízis” szimulációs módszert (1000 bootstrap ismétlésben) választottuk. A két különböző eljárással (Nei és Li, 1979; ill. Link et al., 1995) kapott dendrogramok (3. és 4. ábra) csupán kismértékben tértek el egymástól: az újabb módszerrel (Link et al., 1995) kapott dendrogramon a vizsgált *S. ambosinum* és *S. arnesii* fajok külön alcsoportot képeztek. Az eredményeket felhasználva Poczai Péter hallgató az Országok Tudományos Diákköri Konferencia Agrártudományi Szekciójában, 2007-ben I. helyezést ért el.



3. ábra. *Solanum* fajok genetikai távolságának vizsgálata Nei és Li (1979) módszerével.



4. ábra. *Solanum* fajok genetikai távolságának vizsgálata Link et al. (1995) módszerével.

A vad *Solanum* fajok PVY rezisztenciagénjeinek térképezése céljából hasadó populációkat terveztünk előállítani egyrészt a *S. tarnii* származékainak, másrészt a *S. ambosinum* származék genotípusainak keresztezésével. Több éven át tartó keresztezési törekvéseink nem jártak sikerrel, így e vad fajok PVY rezisztenciagénjeinek molekuláris jellemzésére más megközelítést kellett találnunk. Mivel a *S. ambosinum* azonos származékának (PI 568916) két klónja közül az egyik növény rezisztensnek, a másik fogékonynak bizonyult, ezért a további vizsgálatokban a *S. ambosinum* e származékának fogékony és rezisztens klónjait használtuk fel. Így kiküszöbölhető a hasadó populáció létrehozásának problémája, és azonos fajon belül a rezisztens és fogékony egyedek további RNS-szintű vizsgálatokban felhasználhatóak.

3.5. A génkifejeződés vizsgálata: cDNS szubtrakciós vizsgálatok

Mivel a PVY rezisztenciagének térképezésére alkalmas populációt egyik vad faj esetében - akár fajon belüli, akár fajok közötti hibridizációval – sem sikerült létrehozni, ezért a génkifejeződés indukálását láttuk járható megközelítésnek. A szóba jöhető eljárások, mint például a differential display, a cDNA-AFLP, vagy a cDNS szubtrakció közül az utóbbit választottuk. Ennek oka az volt, hogy számos hazai és külföldi szakemberrel konzultálva (többek között Dr. Endre Gabriellával, MTA Szegedi Biológiai Központ; és Prof. Dr. Philippe Simoneau-val, Angers-i Egyetem, Növénykórtani laboratórium vezetője) a legpozitívabb visszajelzések a szubtrakciós eljárásról jöttek. A cDNS szubtrakció alkalmas arra, hogy két mRNS populációból kiválogassuk azokat, melyek csak az egyikben vannak jelen. Az eljárás elméleti alapja, hogy a mRNS-eket cDNS-sé konvertálják, majd a két különböző cDNS pool-t egymással hibridizáltatják, és a hibrid szekvenciákat eltávolítják. Így a megmaradó, nem hibridizálódott cDNS-ek a két pool között differenciálisan kifejeződő géneket reprezentálják. E géneket a ligált adapterekre specifikus primerek segítségével PCR-rel felszaporítják, hogy a további elemzésekre alkalmas mennyiségű DNS álljon rendelkezésre.

Stratégiánk szerint a PVY vírussal történő fertőzés előtti és utána különböző időpontokban szedett mintákkal terveztük elvégezni a szubtrakciót. Mivel egyidejűleg csak két minta szubtraktálását tudjuk végezni, ezért a fertőzés utáni mintákból ki kellett választanunk egyet, mely feltehetőleg tartalmazza a kérdéses *Ry* génterméket. A PVY fertőzés a burgonyában az extrém rezisztenciagén jelenlétében tünetmentes, és a vírus sem mutatható ki a növényből. Ez feltehetőleg a gyorsan működésbe lépő védekezési mechanizmusnak köszönhető. Más populációkon végzett markerezéses vizsgálatainkból tudjuk - mely eredményeket irodalmi eredmények is megerősítenek -, hogy a PVY extrém rezisztencia monogénes tulajdonság a burgonyában. Mivel azonban semmilyen előzetes molekuláris genetikai információ nem állt rendelkezésre az *Ry* génekről, ezért spekulatív úton kellett kiválasztanunk a vélhetőleg az *Ry* mRNS-eket kellő mennyiségben tartalmazó mintát. A vizsgálatokhoz a fertőzés után két órával szedett mintákat tartottuk a legmegfelelőbbeknek, mert még egy gyors védekezési mechanizmus esetén is számítani lehet arra, hogy elegendő *Ry* mRNS-t tudunk kitisztítani ezekből a mintákból.

A növényeket a fertőzést megelőzően vektor-mentes üvegházban, természetes fényviszonyok és 20-23°C mellett neveltük. A vizsgálatokhoz 6-8 leveles stádiumban lévő növényeket használtunk. A fertőzést a PVY^{NTN} törzs D10-es izolátumával végeztük el. A vírust dohányban (*Nicotiana tabacum* Xanthi-nc) tartottuk fenn. A fertőzéshez karborundum port és foszfát puffert (pH7,0) használtunk. Közvetlenül a fertőzést megelőzően, valamint a fertőzés után 0,5, 1, 2, 4, 8 és 24 órával vettünk 20-20mg levélmintát a növényekről. Kontrollként ugyanezen időpontokban a vírust nem tartalmazó vizes oldattal a fertőzéshez hasonló módon kezelt növényekről is szedtünk mintát. A mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Az RNS tisztításhoz TRIZOL Reagent-et (Gibco BRL) használtunk, RNS-t a fertőzés előtti és a fertőzés után két órával szedett mintákból tisztítottunk. Az RNS-t steril ion-cserét vízben

feloldva, felhasználásig -80°C -on tároltuk. A cDNS szintézist, valamint a szubtrakciót a BD PCR Select cDNA Subtraction (BD Biosciences – Clontech) kittel végeztük.

A szintézis után a cDNS-eket *RsaI* restriktív enzimmel elemésztettük: 1,5 óra 37°C -on, majd az enzim inaktiválását követően fenol:kloroform:izoamil alkoholos (25:24:1) (PCI) kezeléssel kitisztítottuk a DNS terméket. A restriktív fragmentumokra a gyártó által javasolt adaptereket ligáltunk úgy, hogy a fertőzés utáni mintát kétfelé osztottuk, majd két különböző adaptert ligáltunk a két poolhoz. A fertőzés előtti mintához nem ligáltunk adaptereket.

Az első szubtraktív hibridizáció során a fertőzés utáni eltérő adapterekkel ligált két poolhoz hozzákevertük a fertőzés előtti DNS mintát, majd éjszakán át 68°C -on inkubálva segítettük elő a hibrid fragmentumok (fertőzés előtti és utáni azonos szekvenciák denaturálást követően létrejövő hibridjei) kialakulását. A második szubtraktív hibridizációhoz az első hibridizáció két mintáját összekevertük, és újabb friss, fertőzés előtti, emésztett, adapter nélküli DNS-t adtunk hozzá, majd ezt is éjszakán át 68°C -on inkubáltuk. E második hibridizáció célja a differenciálisan jelenlévő fragmentumok eltérő adaptereket tartalmazó hibridjeinek kialakítása volt, mivel az ezt követő PCR-ben csak a két eltérő adaptert tartalmazó fragmentumok tudnak exponenciálisan felszaporodni.

A második szubtraktív hibridizációban kapott termékeket PCR reakció templájként használtuk. A PCR reakcióelegyet a gyártó által biztosított két különböző pufferrel, az adapterekkel komplementer primerpárral, valamint a szintén a gyártó által biztosított 3 különböző polimeráz enzimet tartalmazó keverékkel, valamint Dynazyme (Finnzymes Oy) polimerázzal végeztük el. Az így kapott termékekkel közül elektroforézis után a legjobbat kiválasztottuk, és ezt használtuk egy újabb, „nested PCR”-hez, melyhez a gyártó által javasolt primereket használtunk.

A PCR reakcióban a két végükön azonos adaptert tartalmazó fragmentumok nem tudnak felszaporodni. Ennek oka, hogy az adaptereket úgy tervezték, hogy az azonos adaptert tartalmazó denaturált egyszálás fragmentumok 3' és 5' vége egy hurok formát felvéve egymáshoz hibridizáljon még mielőtt komplementer szekvenciával hibridizálna.

A PCR-eket Robocycler (Stratagene) típusú thermal cycler-ben hajtottuk végre. Az elektroforézishez 1,5%-os agaróz gélt és 0,5xTBE puffert használtunk. A gélképeket GeneGenius (Syngene) géldokumentációs rendszerrel rögzítettük és elemeztük.

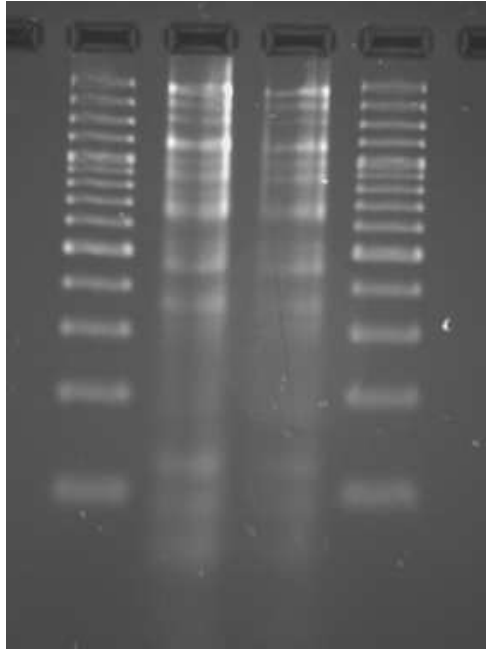
A szubtrakció után kapott génkollekciót molekulárisan klónoztuk (pGEM-T Easy Vector System (Promega), DH5 alfa sejtek), majd kiválasztottuk a megfelelő insert-eket tartalmazó kolóniákat.

A beépített fragmentumokat a T7-SP6 plazmid-specifikus primer párral PCR-rel felszaporítottuk, majd leszekvenáltattuk (Biomi Kft., Gödöllő). A szekvencia információ alapján egyrészt homológia keresést végeztünk a génbanki adatbázisokban, másrészt pedig a szekvenciákra specifikus primer párokat terveztünk a Primer3 primer tervező program segítségével.

A specifikus primer párokkal megvizsgáltuk a kérdéses szekvenciák jelenlétét a vad fajokon, valamint a *S. stoloniferum* eredetű Ry gént tartalmazó White Lady fajtán, és a PVY fogékony S440 jelű vonalon.

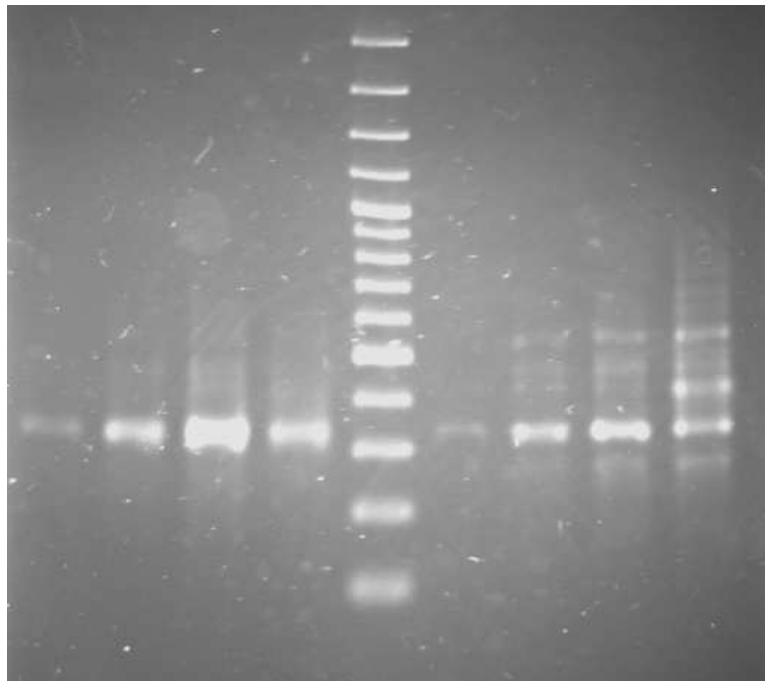
A cDNS szubtrakció eredményei

A szubtrakcióhoz a *S. ambosinum* PVY rezisztens vonalat használtuk modellként. A szubtrakciós eljárásához a Clontech cég „PCR-SELECT cDNA Subtraction” kit-jét használtuk. Az RNS tisztítás eredményét az 5. ábra mutatja.



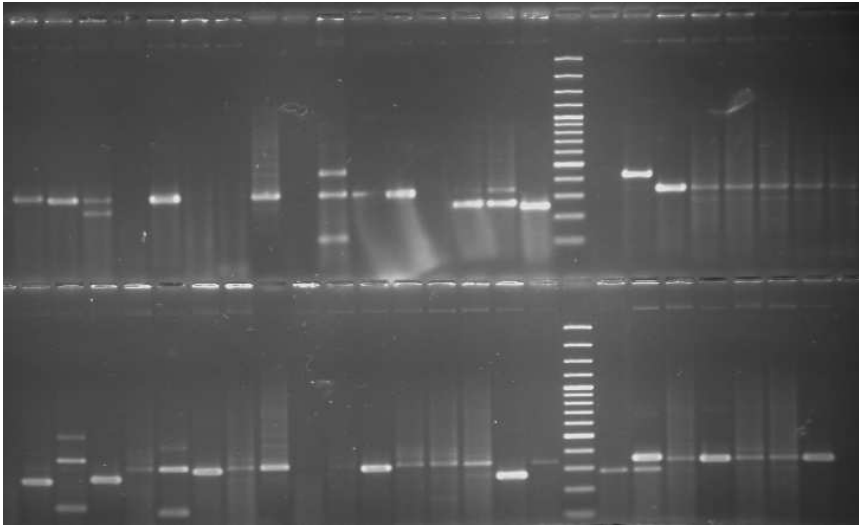
5. ábra. A fertőzés előtt (bal) és utána 2 órával tisztított RNS (jobb), két 100bp-os molekuláris létra között.

A „first”, majd „second strand” szintézis után kapott cDNS-ekhez a kit gyártójának útmutatásait követve *RsaI* restrikciós emésztést követően adaptereket ligáltunk. A szubtraktált termékeket PCR-rel, két különböző puffert használva, felszaporítottuk. A mintákat ugyanazzal a reakcióeleggyel, több ismétlésben raktunk a készülékbe, és 10-től 28 ciklusig két-ciklusonként egy-egy mintát kivettünk a készülékből, hogy kiválaszthassuk a klónozásra optimális állapotút. Ez a 16 ciklusszámú mintánál mutatkozott (6. ábra).

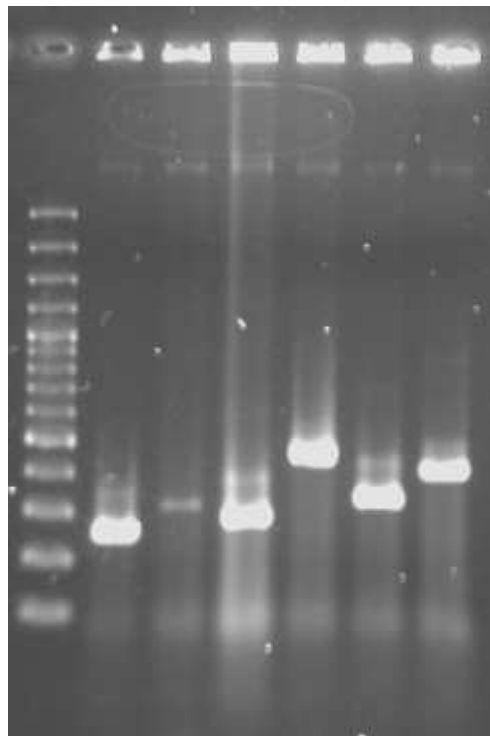


6. ábra. A szubtraktálás utáni „nested PCR” két különböző, a kit gyártója által biztosított pufferben (a 100bp DNS súlymarkertől balra, illetve jobbra). Mindkét esetben a minták 10, 12, 14, illetve 16 PCR ciklus után lettek kivéve a készülékből.

A 16 PCR ciklussal kapott termékeket beklónoztuk, és a kolóniák közül kiválogattuk a szubtrakciós termékekkel azonos méretű fragmentumot tartalmazókat (7. ábra). A plazmidok döntően a kisebb szekvenciákat fogadták be, így a további elemzésekben ezt a 6 darab fragmentumot tudtuk vizsgálni (8. ábra).



7. ábra. A szubtrakciós termékeket tartalmazó kolóniák PCR tesztje a T7-SP6 plazmid specifikus primer párral (a DNS létra 100bp-os).



8. ábra. A szubtraktálás utáni 6 darab beklónozott termék, melyek szekvenálásra kerültek (baloldalt 100bp molekuláris marker, majd tőle jobb felé haladva a minták sorrendje a kolóniák azonosítószáma alapján: 85, 79, 63, 58, 53 és 18).

A beklónozott fragmentumokat leszekvenáltattuk (Biomi Kft, Gödöllő). A szekvenciák összehasonlító elemzése alapján három darab szekvencia egymásra illeszkedett. Bár három

nukleotidban eltérés mutatkozott e szekvenciák között, mégis a továbbiakban egyetlen, konszenzus szekvenciaként kezeltük őket.

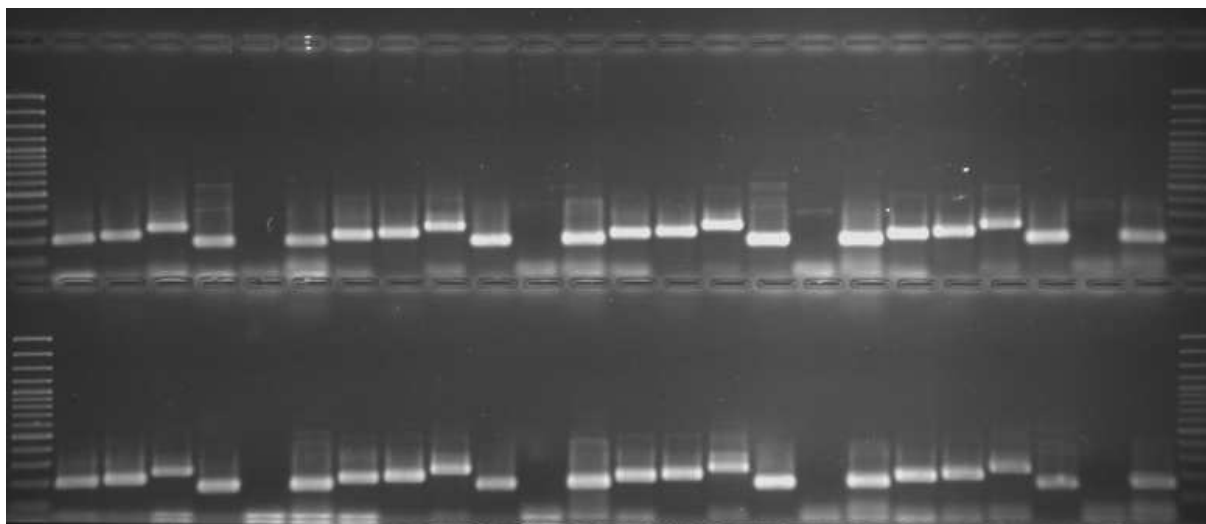
A fenti konszenzus szekvenciával és a többi, egymásra nem illeszkedő szekvenciával homológia-keresést végeztünk a génbanki adatbázisokban. A homológiát a 100 első találatig vizsgálatuk. Mindegyik szekvencia döntően stressz-indukált EST-ékkal, illetve cDNS-ekkel adott találatot. A találatok jelentős része a *Solanaceae* családból származó szekvenciákkal mutatkozott. Minden szekvencia esetében találtunk 100%-os, vagy ahhoz közeli homológiát. A szekvencia-információ alapján a Primer3 programmal specifikus primer párokat terveztünk (3. táblázat).

3. táblázat. A szubtraktálás utáni szekvenciákra specifikus primer párok (A baloldali oszlop a szekvenciák azonosító jelét tartalmazza).

SEQ-18F	5'-CAT CCG CCC CAG ATA AAC TA-3'
SEQ-18R	5'-GTA AGA CCC CGT GCA CCT TA-3'
SEQ-53F	5'-AAC CTG TCT CAC GAC GGT CT-3'
SEQ-53R	5'-TCG GAA TTC GAA GCT AGA GG-3'
SEQ-58F	5'-TGT CGG CCA AGG CTA TAA AC-3'
SEQ-58R	5'-ATG GCC GTT CTT AGT TGG TG-3'
SEQ-63F	5'-GTT CCC TAT TGG TGG GTG AA-3'
SEQ-63R	5'-CGA GGT CGA AGC TAG AGG TG-3'
SEQ-79F	5'-CCC CTT CTT CCC CTT CAA T-3'
SEQ-79R	5'-GGC CCC TAC TGA AGA TAG GTC-3'
SEQ-85F	5'-AAC CTG TCT CAC GAC GGT CT-3'
SEQ-85R	5'-GGT GGA TAA CTG GCT TGT GG-3'

A szekvencia-specifikus primer párokkal PCR reakciót hajtottunk végre a vad *Solanum* fajokon, a White Lady fajtán és az S440 nemesítési vonalon (9. ábra). A White Lady fajtában a PVY extrém rezisztencia a *S. stoloniferum* fajból származik, míg az S440 fogékony erre a vírusra. A vizsgált növények a PVY rezisztenciájuktól függetlenül egy kivételével az összes fragmentumot tartalmazták. Ez arra utal, hogy ez az öt szekvencia, - bár stressz-indukált gének részei -, nem specifikusan a PVY fertőzésre kifejeződő *Ry* génből származnak.

A PVY fogékony *S. arnesi*, valamint a rezisztens *S. tarnii* esetében a 79-es azonosítószámú szekvenciára kaptunk ugyan halvány terméket, de ez mindkét esetben nagyobb méretű volt a vártnál. Ugyanígy a PVY fogékony *S. ambosinum* esetében több halvány terméket is kaptunk, de ezek is nagyobbak a szekvencia információ alapján várt termékénél. A PVY rezisztens *S. ambosinum*-ban viszont, - melyből a 79-es szekvencia származott, - nem kaptunk terméket. Ez a reakció-optimalizálás és egyéb esetleges módszertani problémák lehetősége mellett arra is enged következtetni, hogy ez a cDNS szekvencia a genomiális DNS-en egy nagyobb méretű intront tartalmazhat, melyet az alkalmazott PCR feltételek mellett nem sikerült kimutatni.



9. ábra. A 6 db szubtraktálás utáni szekvencia vad *Solanum* fajokban, valamint a White Lady fajtában és az S440 nemesítési vonalban [a 6 szekvencia sorrendje balról jobbra a kolóniák azonosítószáma alapján: 18, 53, 58, 63, 79 és 85. A növényminták sorrendje felül baloldaltól kezdve (az elektroforetogram bal és jobb oldalán 100bp DNS létra): *S. acroscopicum*, *S. arnesi*, *S. tarnii*, *S. ambosinum* (PVY fogékony akszesszió), *S. ambosinum* (PVY fogékony és rezisztens biotípust is tartalmazó akszesszió), *S. ambosinum* (PVY rezisztens akszesszió), White Lady, S440].

A cDNS szubtrakciós vizsgálataink során sikerült stressz-indukált géneket kimutatnunk a fertőzés utáni minta fertőzés előtti mintával történő szűrésével. Az eddig vizsgált génjelöltek közül a 79-es számú klón PVY rezisztenciával való esetleges kapcsoltságára egyelőre nem kaptunk választ. A többi szekvencia esetében nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy ezek adott cDNS-ek kisebb darabjait (200-300bp) reprezentálják csak, így nem tudjuk, hogy az ezeken kívül eső szakaszok tartalmazzak-e eltéréseket a rezisztens és fogékony genotípusok között. Ezt a lehetőséget a rezisztenciagénekre jellemző nagyfokú hasonlóság, illetve tipikus motívumok (NBS, LRR, stb.) ismerete miatt nem szabad kizárnunk. A nagyszámú, stressz-indukált EST-ével, illetve cDNS szakasszal mutatott homológia ellenére nem találtunk az adatbázisokban olyan klónt, mely teljes cDNS-t tartalmazott volna. Ezért jelenleg a vizsgált szekvenciáinkat tartalmazó cDNS-ek izolálását végezzük. A 79-es számú klón esetében egyrészt a reakció feltételek optimalizálásán, illetve itt is a teljes cDNS izolálásán dolgozunk. Ezek mellett a genomiális DNS-t LA (long and accurate) PCR-rel tervezzük vizsgálni.

Egyelőre közel 400 leellenőrzött kolónia között még nem találtunk olyan klónokat, melyek a szubtraktálás utáni nagyobb méretű (500-750bp) fragmentumokat tartalmazták volna. A kolónia-screening folytatása mellett a gélből visszatisztítjuk a nagyobb fragmentumokat és ismét beklónozzuk, hogy a konkurens, és a klónozás szempontjából preferenciát élvező kisebb fragmentumokat kiszoríthassuk. Ezután a nagyobb fragmentumok szekvencia elemzését és ellenőrzését is elvégezzük.

Az itt bemutatott vizsgálatok nem képezték szerves részét a kutatási szerződés munkatervének, azonban, mivel éveken keresztül hiába történtek próbálkozások térképezésre alkalmas hasadó populáció előállítására, folyamodtunk a génexpressziós megközelítéshez. Bár a választott technika összetett és bonyolult, eredményeink azt mutatják, hogy módszertani értelemben ígéretes. A PVY vírus veszélyessége miatt nemzetközi viszonylatban számos kutatócsoport dolgozik PVY extrém rezisztenciagének molekuláris jellemzésén. Ugyanakkor az eddig közölt markerezési és térképezési eredmények ellentmondásosak, még egyetlen izolált *Ry* génről sem tudunk.

A kutatási program legjelentősebb eredményeinek a szubtrakciós hibridizációval kapott adatainkat tekintjük. A módszer adaptációja és optimalizálása további kutatási programjainkat meghatározó módon segíti. E vizsgálatokat a kutatómunka utolsó időszakában (2006-2007. március 31.) fejeztük be, ezért az eddigi eredményeink alapján a kutatásokat tovább folytatjuk, és eredményeink további publikálását a közeljövőben elvégezzük. Munkánk folytatása és az alkalmazott módszer finomítása (pl. a mintavétel időpontja) reményeink szerint hozzájárul e jelentős rezisztenciagének tudományos megismeréséhez és a szerzett információk gyakorlati nemesítésben történő alkalmazásához.

Kutatóközösségünk köszönetét fejezi ki az OTKA-nak a kutatási program támogatásáért.

4. Irodalmi hivatkozások

- Beczner, L., Horváth, J., Romhányi, I., Förster, H. (1984) Studies of the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research* 27, 339-352.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *PNAS* 93(12):6025-6030.
- Flis, B. Henning, J., Strzelczyk-Zyta, D., Gebhardt, C., Marczewski, W. (2005) The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extrem resistance 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.
- Heldák, J., Bežo, M., Štefúnová, V., Forišeková, K., Debreová, K. Galliková, A. (2005) Retrotransposons in genotyping and molecular characterisation of potato resistance to PVY in potato. 16th Triennial Conference of the EAPR, July 17-22, Bilbao, Spain. p. 97-100.
- 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 a tetraploid potato. *Am. Potato J.* 78:191-196.
- Kasai, K., Morikawa, Y., Sorri, V.A., Valkonen, J.P.T., Gebhardt, C., and Watanabe, K.N. (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.
- Milbourne, D., Meyer, R.C., Collins, A.J., Ramsay, L.D., Gebhardt, C., Waugh, R. (1998) Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259:233-245.
- Walbot, V. és 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.
- Nei, M. and Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* 76:5269-5273.
- Link, W., Dixens, C., Singh, M., Schwall, M., Melchinger, A.E. (1995) Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *TAG* 90:27-32.
- Van de Peer, Y. and Y. de Wachter (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environments. *Comput Appl Biosci* 10:569-570.