

## Tudományos beszámoló

### ***A Solanum stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus immunitás gén ( $Ry_{sto}$ ) finomtérfépezése és lokalizálása a tetraploid burgonya genomba**

című OTKA 063568 pályázatról

#### *Bevezetés*

A magyarországi burgonya termésátlag a fejlett EU tagországokénak csak mintegy 50% -át éri el. Ennek legfőbb oka – a nem megfelelő agrotechnikán túl - a vírusfogékony, ezáltal leromlásra hajlamos fajták használata. Növénykórtani szempontból a leromlásban egyik legnagyobb szerepe a minden évben járványt okozó burgonya Y vírusnak (PVY) van. A vírus terjedésének biológiájából adódóan kemikáliákkal csak korlátozottan védekezhetünk ellenük. A legcélravezetőbb megoldást a kórokozó kártételének kiküszöbölésére ezért, a fertőzés gátlása jelentheti, amelyet a rezisztens fajták előállításával, és termesztésbe vonásával biztosíthatunk. A rezisztencia kialakításának eszköze a vad fajok, mint rezisztencia-források bevonása a termesztett burgonya nemesítésébe. Ez a folyamat a célgénhez kapcsolódó nemkívánatos tulajdonságok kiszűrése, valamint a rezisztencia és a komplexen öröklődő minőségi tulajdonságok együttes kialakítása miatt rendkívül időigényes. A molekuláris genetika azonban új lehetőségeket nyújt – adott génnel kapcsoltan öröklődő DNS-alapú markerek azonosítása révén – a szelekció, és így a nemesítés folyamatának egyszerűsítésére.

#### *Célkitűzés*

Jelen kutatási programunk célja, a fent említettekkel összhangban, tehát a keszthelyi burgonyafajtákra jellemző *Solanum stoloniferum* eredetű PVY extrém rezisztencia génhez ( $Ry_{sto}$ ) kapcsolt újabb markerek detektálása, a gén finomtérfépezése és egy - ezeken a markereken alapuló - szelekciós rendszer kidolgozása és alkalmazása a gyakorlatban.

#### *Eredmények*

Munkánk során a 2005. évben keresztezést végeztünk a keszthelyi nemesítésű White Lady (WL) és az S440 amerikai nemesítési vonal között. A keresztezésben hímsterilitása miatt anyai vonalként használt WL extrém rezisztens a PVY minden törzsével szemben, míg a pollen donor (S440) fogékony a kórokozóra. A kapott  $F_1$  populáció tehát hasad a  $Ry_{sto}$  génre nézve.

A keresztezésből fogott magokból a 2006. év során - vektormentes üvegházban – 506  $F_1$  genotípust neveltünk fel, majd az alattuk fejlődött gumókat újból elültetve az egyes genotípusokat felszaporítottuk, és fenotipizáltuk. Ennek során a növényeket a PVY<sup>NTN</sup> törzsével mechanikailag megfertőztük, majd a vírus jelenlétét DAS-ELISA módszerrel vizsgáltuk. A tesztek során azonosított rezisztens és fogékony növények száma 1:1 hasadási arányt mutatott, amely a gén szimplex állapotát jelzi a tetraploid WL genomjában.

A kutatási program következő lépéseként, a fenotipizált növényekből DNS-t izoláltunk. A mintákat két a  $Ry_{sto}$  génnel kapcsolt markerrel (*SCAR<sub>ysto4</sub>*, *STM0003-111*) vizsgáltuk, a markerek szelekciós hatékonyságának ellenőrzésére. Eredményeink azt mutatják – habár a két

marker relatíve nagy genetikai távolságra helyezkedik el egymástól – 99%-os biztonsággal alkalmazhatóak a *Ry<sub>sto</sub>* gént hordozó genotípusok azonosítására.

A 2006. év folyamán a WL és S440 vonal között újabb keresztezést végeztünk, így további 600 F<sub>1</sub> genotípust állítottunk elő, a növények alatt fejlődött gumók számától függően 1-11 klónnal. Az egyedeket - hasonlóan a korábban említettekhez - fenotipizáltuk, majd a növényekből DNS-t izoláltunk és a hagyományos rezisztencia tesztek eredményeit molekuláris vizsgálatokkal is megerősítettük. Az utódpopuláció ebben az esetben is, a vártnak megfelelően 1:1 hasadási arányt mutatott.

A munka során így, mintegy 1100 F<sub>1</sub> utódot tartalmazó populációt állítottunk elő, amely már alkalmas a *Ry<sub>sto</sub>* gén finomtérképezésére.

Egy korábbi OTKA pályázat keretében azonosított négy, a *Ry<sub>sto</sub>* génnel szorosan kapcsolt RAPD markerből egyet az elmúlt években már sikeresen SCAR markerré alakítottunk (*SCARy<sub>sto</sub>4*). A további munkánk során a géntől 3 cM genetikai távolságra térképeződött *RAPD6846* markert a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközponttal együttműködve klónoztuk és szekvenáltuk. A szekvencia alapján új primereket terveztünk a fragmentum specifikus felszaporításához. Az új markert, melyet *STI*-nek neveztünk el a térképező populációnkban visszaellenőriztük. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az *STI* marker, az eredeti RAPD fragmentummal megegyező hasadást mutat. A marker használatával, mivel az a *SCARy<sub>sto</sub>4* markerhez képest a génhez közelebb helyezkedik el, növelhető a marker alapú szelekció pontossága.

A munka folytatásaként a génhez legközelebb térképezett *RAPD9621* marker is klónozásra került. A megfelelő méretű kolóniák kiválasztása és felszaporítása utána a fragmentumot szekvenáltattuk. A nukleotid sorrend alapján új primereket terveztünk a fragmentum specifikus felszaporításához. Az új markert hasonlóan az előzőkhöz, a térképező populációnkban visszaellenőriztük. A vizsgálataink során a specifikus primerek habár a megfelelő méretű terméket amplifikáltak azonban az monomorf mintázatot mutatott. Természetesen a munkát továbbfolytatjuk, egyrészt a már meglévő szekvenciára új primer párok tervezésével, másrészt és újabb inzertek kiválasztásával és szekvenálásával.

A *Ry<sub>sto</sub>* génnel kapcsolt újabb markerek azonosítása érdekében tovább folytattuk a korábban hatékonyan bizonyult RAPD analízist. Ennek során a hasadó populáció egyedek és a szülőknél RAPD primerek több mint 500 különböző féle kombinációját teszteltük. A vizsgálatok során mindössze egy új RAPD markert (*RAPD832-2*) azonosítottunk, amely ugyan kapcsolatot mutat a génnel, azonban attól, a korábban detektált markerekhez képest távolabbra térképeződik. A marker így a nagy genetikai távolság miatt szelekcióra önmagában nem alkalmas, azonban mint új térképi pozíció felhasználható.

További vizsgálataink során a RAPD analízis mellett új technikákat – IT (*Intron-targeting*), RGA (*Resistance Gene Analogues*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) és SCoT (*Start Codon Targeted*) analízist - is alkalmazunk a *Ry<sub>sto</sub>* génnek szorosan kapcsolt markerek azonosításához.

Az IT rendszert a világon elsőként alkalmaztuk a burgonya molekuláris genetikai kutatásokba. A módszer során 129 primer párt terveztünk, az adatbázisokban elérhető, már klónozott - tehát ismert szekvenciájú – burgonya gének, illetve egyéb burgonya, paradicsom és *Arabidopsis* szekvenciák (mRNS, cDNS) alapján. A klónozott gének esetén a primereket, az intronokat közrefogó exonokra terveztük úgy, hogy azok az intront amplifikálják. Egyéb szekvenciáknál, mivel az intronok helye nem ismert ezért a szekvenciákkal homológia keresést végezve a primereket a valószínűsíthető intront határoló exon régiókra terveztük. A primereket első lépésben a térképező populáció két szülőpartnerén, és hat (három PVY rezisztens és három fogékony) F<sub>1</sub> genotípuson teszteltünk. Harmincnégy primer pár esetén sikerült hossz-polimorfizmust azonosítanunk. Ezeket, mint marker jelölteket a hasadó populáció F<sub>1</sub> genotípusain tovább vizsgáltuk. Egyedül a burgonya kataláz génjének (génbanki

szám: Z37106) 2. intronjára tervezett primer párral azonosított hossz-polimorfizmus mutatott kapcsoltságot a  $Ry_{sto}$  génnel. Ez a lókuszt melyet *Cat-in2*-nek neveztünk el 12,5 cM genetikai távolságra térképeződött a géntől. Génbanki adatbázisok további elemzése feltárta, hogy a lókuszt tartalmazó fenti kataláz gén a korábban egy német kutatócsoport által a burgonya XII. kromoszómájára térképezett *S2g1* markert is tartalmazza. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy hasonlóan az *S2g1* markerhez, az általunk azonosított lókuszt is a burgonya XII. kromoszómáján lokalizálódik. Érdekes, hogy a *Cat-in2* marker esetén a rezisztens szülőben és a rezisztens  $F_1$  utódokban három fragmentum, míg a PVY fogékony szülőpartnerben és  $F_1$  genotípusokban csak egy termék amplifikálódik. Ennek magyarázata egy a PCR során keletkezett ún. heteroduplex lehet. Tizenhat primerpár esetén melyek egy, monomorf fragmentumot amplifikáltak SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*) analízist végeztünk a fragmentumokban rejlő pontmutációk azonosítása érdekében. Ismert, hogy az ilyen jellegű pontmutációk is felhasználhatók markerként. Sajnos azonban egyik szekvenciában sem sikerült nukleotid szintű polimorfizmust kimutatnunk.

Az IT analízist ugyanakkor, a RAPD markerekből az eddig elkészült részleges térképen a kapcsoltsági csoportok lokalizálására is használhatjuk, hiszen a módszerrel azonosított markerek bizonyos esetekben ismert pozíciójú gének részei, másrészt - mint a kataláz esetében is – már térképezett markerek részei lehetnek. Ilyen módon sikerült – a fent említetteknek megfelelően - a  $Ry_{sto}$  gén helyzetét meghatározni a tetraploid burgonya genomában. A rezisztencia gén és a kataláz gén között kimutatott kapcsoltságot minden eddigénél egyértelműbb bizonyíték a  $Ry_{sto}$  gén XII kromoszómán való elhelyezkedésére.

Az RGA vizsgálatok során ezidáig tíz primerpárt teszteltünk a térképező populáció két szülőpartnerére valamint öt rezisztens és öt fogékony  $F_1$  genotípus között. Az analízis során több polimorfikus szekvenciát is detektáltunk, melyeket a térképező populáció  $F_1$  genotípusain vizsgáltunk. A markerek azonban nem mutattak kapcsoltságot a  $Ry_{sto}$  génnel.

Az ISSR és SCoT analízisekkel összesen 47 további polimorfizmust azonosítottunk, amelyek közül egyik marker sem mutatott kapcsoltságot a génnel.

A detektálható újabb markerek hiányának magyarázata lehet, hogy a burgonya XII. kromoszómájának  $Ry_{sto}$  gént tartalmazó régiója nagyon konzervált lehet, hiszen mind az irodalmi adatok, mind a nemzetközi tapasztalatcserék azt igazolják, hogy a kevés polimorfizmus miatt nehéz markereket azonosítani ebben a régióban.

Látható, hogy a munkánk során nem sikerült a korábbi markereinknél közelebb térképeződő, újabb markerek azonosítása egyik technikával sem, de a polimorf szekvenciák térképezésével részleges kapcsoltsági térképet tudtunk készíteni, a térképező populáció két szülőpartnerében. A S440 vonalban készített térkép 83 markert tartalmaz, melyek 18 kapcsoltsági csoportba rendeződnek. A kapcsoltsági csoportok 2-13 számú markerből épülnek fel. Egy kapcsoltsági csoportot sikerült hozzárendelnünk a burgonya megfelelő kromoszómájához is. Egy kapcsoltsági csoport esetén pedig a homológ kromoszómát is azonosítani tudtuk a markerek cisz-transz elhelyezkedése alapján.

A WL fajtában készített térkép 73 markert tartalmaz, melyek 13 kapcsoltsági csoportba rendeződnek. A kapcsoltsági csoportok 2-18 számú markerből épülnek fel. Két kapcsoltsági csoportot sikerült hozzárendelnünk a burgonya megfelelő kromoszómájához is. Három kapcsoltsági csoport esetén pedig a homológ kromoszómát is azonosítani tudtuk a markerek cisz-transz elhelyezkedése alapján. Végül, a mindkét szülőben jelen lévő azonos markerek alapján pedig elkészítettünk egy konszenzus térképet melyeken meghatároztuk az egymásnak megfelelő kapcsoltsági csoportokat.

A 2008. év során elkészítettünk egy a WL teljes genomját lefedő BAC klóntárat is, amely a továbbiakban egy új, a génhez szorosan kapcsolt (<1 cM) marker azonosítása esetén, mint kiindulási pont lehetőséget nyújt a gén fizikai izolálását célzó 'genomséta' megkezdésére.

Eredményeinkkel reményeink szerint új alapokra helyezhetjük a Keszthelyen hat évtizede folyó Y vírus rezisztencia nemesítői munkát. A kutatásaink során azonosított markerekkel a nemesítés folyamata felgyorsítható, annak költségei csökkenthetőek. Ugyanakkor több marker együttes alkalmazása lehetővé teszi majd különböző tulajdonságok szimultán szelektálását is, mellyel még rövidebbé és költséghatékonyabbá válhat a nemesítés folyamata.

*A pályázathoz kapcsolódóan megjelent publikációk*

- 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<sub>sto</sub>*, 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<sub>sto</sub>* gene based on linkage to a catalase gene on chromosome XII in the tetraploid potato genome. *Breeding Science*. 58:309-314.
- Cernák I, Decsi K, Vaszi Z, Wolf I, Polgár Z, Taller J (2008) PCR-alapú markerek alkalmazása a PVY extrém rezisztenciagént hordozó burgonya genotípusok szelekciójára. *Növénytermelés*. 57: 245-251
- 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. Növénynevelési Tudományos Napok. Összefoglalók: 60.
- Cernak 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. ISBN: 978-973-598-314-7
- Z. Polgar, Wolf, I., Cernak, I., Taller, J. (2008) Introduction to the current results of potato breeding programme at Keszthely. 59. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2008, 1 – 3, ISBN: 978-3-000000-00-0, Raumberg-Gumpenstein, 25-27 November, 2008.