

Zárójelentés

OTKA 79185 K

„A White Lady burgonyafajta - *Solanum demissum* eredetű - fitoftóra rezisztenciájának vizsgálata molekuláris markerek és kapcsoltsági térkép segítségével

A kutatási pályázat célkitűzése, a keszthelyi Burgonyakutatási Központban nemesített White Lady burgonyafajta fitoftóra rezisztenciájának vizsgálata volt, mesterséges fertőzési tesztekkel és molekuláris genetikai módszerekkel. A Keszthelyen nemesített fitoftóra rezisztens burgonya fajták, fő rezisztenciaforrása a *Solanum demissum* vad burgonya faj. Ez a faj 11 különböző, hiperszenzitív alapon rezisztenciát biztosító gént hordoz (R1-R11 rezisztencia gének), mely tulajdonságai miatt a nemesítési programokban előszeretettel használják. Előzetes eredményeink alapján a White Lady széles spektrumú rezisztenciával rendelkezik a fitoftóra fertőzésével szemben, azonban a rezisztenciáért felelős gén, gének még nem voltak ismertek.

Mindezeket figyelembe véve, célul tűztük ki, a White Lady fajtában jelen lévő *S. demissum* eredetű fitoftóra rezisztencia gén(ek) meghatározását, a gén(ek) térképezését, valamint a gén(ek)hez kapcsolt markerek fejlesztését, amelyek gyakorlati alkalmazásával a nemesítés hatékonysága növelhető.

Mesterséges fertőzési tesztek

Kutatásink során első lépésben elvégeztük a WL és az S440 nemesítési vonal mesterséges fertőzését több ismétlésben, a nemesítési anyagunkban jelen lévő fitoftóra rezisztencia gén meghatározása érdekében. Az ún. leválasztott levélteszt során a növényekről 3-3 levelet gyűjtöttünk, melyet mesterségesen fertőztünk három különböző fitoftóra izolátummal. A H11/8 izolátum az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es 6-os, 7-os, 10-es, 11-es avirulencia géneket tartalmazta, de nem tartalmazza az 5-ös, 8-a és 9-es avirulencia géneket. A H12/10 izolátum tartalmazza az 1-es, 3-as, 4-es, 7-es, 10-es és 11-es, de nem tartalmazza a 2-es, 5-ös, 6-os, 8-as és 9-es avirulencia géneket. Míg a harmadik WL1-es izolátum az 1-es, 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 10-es és 11-es rasszokat tartalmazza, és nem tartalmazza a 8-as és 9-es avirulencia rasszokat.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a H11/8-as és a H12/10-es jelű izolátumok nem, míg a WL1 izolátum fertőzte a WL-t. A térképező populáció másik szülőpartnerét az S440 nemesítési vonalat a vártnak megfelelően mindegyik izolátum fertőzte, mivel ez a genotípus nem tartalmaz a fitoftórával szemben rezisztenciát biztosító gént. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a WL az R5 rezisztencia gént hordozza, így további kutatásaink e gén markerezésére és térképezésére irányultak.

A kutatási program következő lépésében fenotipizáltuk, a WL és S440 keresztezéséből származó 77 F₁ genotípust is. Ehhez hasonlóan a szülőpartnerek vizsgálatához, mesterségesen fertőztük genotípusokat a H12/10 izolátummal. A fertőzést követő 4. napon a lézió átmérőket felvételeztük. Vizsgálatok során 47 rezisztens és 65 fogékony genotípust különítettünk el, amely 1:1 hasadási aránynak felel meg. Ebből arra következtethetünk, hogy a WL szimplex formában hordozza az R5 rezisztencia gént. Ugyanakkor a kissé torz hasadási arány arra

enged következtetni, hogy egy nagy hatású 'fő' rezisztencia gén mellett esetleg kisebb hatású a fitoftóra rezisztenciában szerepet játszó gének is jelen lehetnek a WL genetikai hátterében.

Molekuláris vizsgálatok

Irodalmi adatok szerint az R5 rezisztencia gén az R3 fitoftóra rezisztencia gén allélikus verziója. Mivel az R3 gént kromoszómális pozíciója ismert (burgonya XI. kromoszómája), ezért a molekuláris vizsgálatok első lépésében teszteltük, az R3 gén specifikus primereket, valamint a XI. kromoszómára specifikus markereket. Munkánk során azonban nem sikerült kapcsoltságot kimutatni a R5 és az R3 gén között, illetve nem találtunk kapcsoltságot a XI. kromoszóma specifikus markerekkel sem. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a gén nem a XI. kromoszómán lokalizálódik.

Mivel egy korábbi kutatási programban, amely a *Solanum stoloniferum* eredetű PVY extrém rezisztencia gén markerezését célozta, létrehoztunk egy részleges kapcsoltsági térképet a WL-ben, megpróbáltuk az F1 genotípusok fenotípezálása során kapott adatokat a térképre illeszteni. A szoftveres analízis során az R5 fitoftóra rezisztencia gén egy olyan kapcsoltsági csoportba térképeződött, amelyet ezidáig nem sikerült a megfelelő burgonya kromoszómához hozzárendelni. Konszenzus markerek alapján, ugyanakkor meghatároztuk a gént tartalmazó kapcsoltsági csoportnak megfelelő kapcsoltsági csoportot az apai partnerben is. Ez a kapcsoltsági csoport tartalmaz egy markert, amely fizikailag a burgonya V. kromoszómáján helyezkedik el. Ezek az eredmények tehát közvetetten azt mutatják, hogy az R5 gén esetleg a burgonya V. kromoszómáján lokalizálódhat. Ugyanakkor egyéb az V. kromoszómára specifikus markerekkel ezt a feltételezést nem sikerült megerősíteni.

Mivel a R3 gén-specifikus marker kimutatható volt a WL-ben, a kutatások további részében a szakirodalomban rendelkezésre álló, már klónozott fitoftóra rezisztencia génekre (R1, R2, R3a, R3b) tervezett, génspecifikus primereket is leteszteltük a White Lady-ben és az S440 genotípusban, a fertőzési tesztek során kapott eredmények megerősítésére.

Az elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a WL nem tartalmazza az R1 rezisztencia gént, de tartalmazza az R2, R3a és R3b jelű géneket. Mivel az R8 rezisztencia gént még nem izolálták, nem áll rendelkezésre a gén kimutatására alkalmas primer pár. Mindössze egy a génnel kapcsolt marker állt rendelkezésünkre, amelynek vizsgálatából következtethetünk az R8 gén jelenlétére vagy hiányára. Vizsgálataink során azonban nem tudtuk a markert a WL-ben kimutatni. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a WL nem hordozza az R8-as rezisztencia gént. A kontrollként használt „r” jelű növény minden vizsgálat során a várt eredményt mutatta, egyetlen rezisztencia gént sem tudtunk benne kimutatni.

Eredményeink megerősítésére elvégeztük a PCR reakciók során amplifikált termékek klónozását és szekvenálását, génenként és egyedenként 3-3 ismétlésben. A kapott szekvenciákkal homológia keresést végeztünk a nyilvános adatbázisok (NCBI, DDBJ) alapján. Minden esetben 98-100%-os egyezőséget kaptunk az általunk amplifikált termékek és az ismert fitoftóra rezisztencia gének között. Azon esetekben, amelyekben „csak” 98%-os egyezés volt kimutatható, az eltérés a szekvenálás során keletkező „missmatch”-eknek volt köszönhető. Ennek alapján a WL nem csak az R5 gént hordozza, hanem az R2, R3a, és R3b fitoftóra rezisztencia géneket. Mivel az itt felsorolt géneket már izolálták, és specifikus primerek segítségével kimutathatóak, így ezen gének marker alapú szelektálása lehetővé válik saját nemesítési anyagainkban.

A kutatásaink további részében, a kitézett céloknak megfelelően, kapcsolt markert próbáltunk azonosítani az R5 génhez, amelyhez az Biotechnológia Csoportban kifejlesztett Intron-taragting (IT) rendszert használtuk. A vizsgálatok során több mint 100 primerpárt terveztünk, melyeket a térképező populáció két szülőpartnerén és az F1 utódokon teszteltünk. Tíz markert azonosítottunk, amelyek polimorfizmust mutattak a szülők és az F₁ utódok között. Ugyan a

markerek egyike sem mutatott kapcsoltságot az R5 génnel, azonban azok a meglévő kapcsoltsági térképre illesztve újabb térképi pontokként használhatóak.

Jelen vizsgálatok igazolták, hogy a kiváló összetett rezisztenciával (vírusok, fonálféreg, burgonyarák) rendelkező WL fitoftóra rezisztencia tekintetében is egyedülálló. Mesterséges fertőzési tesztek és molekuláris genetikai vizsgálatok támasztják alá, hogy a fajta tartalmazza a *S. demissum* eredetű fitoftóra rezisztencia gének közül az R2, R3a, R3b és az R5 géneket. Ezáltal kimagasló ellenállóságot mutat e különösen veszélyes és nagy jelentőséggel bíró kórokozóval szemben.

Noha a jelen kutatási programban nem sikerült az R5 génnel szorosan kapcsolt markert azonosítanunk, a térképezési munka folytatásával reményeink szerint térképezni tudjuk a rezisztenciáért felelős gént. Ugyanakkor az R2, R3a, R3b gének molekuláris szintű kimutatása a keszthelyi nemesítési anyagokban lehetőséget ad ezen gének marker alapú nyomon követésére, szelekciójára. A marker alapú szelekció alkalmazásával jelentősen pontosabbá, gyorsabbá és így hatékonyabbá tehetjük a fitoftórával szemben rezisztens fajták előállítását célzó nemesítői munkát, megőrizve, illetve javítva a hazai nemesítők fitoftóra rezisztencia kialakításában elért kedvező nemzetközi helyzetét.

Témához kapcsolódó közlemények:

Decsi K., Cernák I., Bánfalvi Z., Korom E., Wolf I., Vaszily Z., Taller J., Polgár Z (2012):
Marker assisted selection of the *Solanum stoloniferum* based PVY resistance in the breeding material of Keszthely.
ScienceMED, vol.3, issue 3. p.215-219. ISBN 978-88-7587-648-7.

Gorji A. M., K. K. Matyas, Z. Dublec, K. Decsi, I. Cernak, B. Hoffmann, J. Taller, Z Polgar (2012):
In Vitro Osmotic Stress Tolerance in Potato and Identification of Major QTLs
Am. J. Pot. Res. 89:453–464, DOI 10.1007/s12230-012-9268-x

Gorji A.M., P. Poczai, Z. Polgar, J. Taller (2011):
Efficiency of Arbitrarily Amplified Dominant Markers (SCOT, ISSR and RAPD) for Diagnostic Fingerprinting in Tetraploid Potato
American Journal of Potato Research: Vol 88, No 3. pp. 226-237.
DOI: 10.1007/s12230-011-9187-2

D. Andrivon, J. Avendaño-Córcoles, A. M. Cameron, S. F. Carnegie, L. R. Cooke, R. Corbière, D. Detourné, L. J. Dowley, D. Evans, K. Forisekova, D. G. Griffin, A. Hannukkala, A. K. Lees, R. Lebecka, F. Niepold, Z. Polgar, D. S. Shaw, J. Thompson, B. Trognitz, H. M. G. van Raaij, E. Zimnoch-Guzowska (2010):
Stability and variability of virulence of *Phytophthora infestans* assessed in a ring test across European laboratories
Plant Pathology. 11/2010; 60(3):556 - 565. DOI:10.1111/j.1365-3059.2010.02392.x

Hainjafar R., Polgar Z., Taller J. (2013):
Next generation sequencing based identification of late blight resistance genes in potato.
XXIII. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum, előadás, Abstract megjelenés alatt.

- Hajianfar R, K. Decsi, B. Kolics, J. Taller, Z. Polgar, I. Wolf (2012):
Study on resistance genes to potato late blight in the White Lady variety.
LIV. Georgikon Napok, Keszthely, 2012 október 11-12, Kivonat-kötet, 60. oldal,
ISBN 978-963-9639-47-8
- Cernák I., Decsi K., Yasin M.A., Gorji A.M., Ahmadvand R., Wolf I., Taller J., Polgár Zs.
(2012):
Referenciaként használható kapcsoltsági térkép szerkesztése tetraploid burgonyában.
XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2012 március 6.,
Összefoglalók: 67. o. ISBN 978-963-8351-38-8 (poszter)
- Decsi K., Cernák I., Yasin M.A., Wolf I., Taller J., Polgár Zs. (2012):
Kapcsoltsági térkép szerkesztése és fitoftóra rezisztencia gén markerezése
burgonyában.
XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2012 március 6.,
Összefoglalók: 68. o. ISBN 978-963-8351-38-8 (poszter)
- Polgár Zsolt (2012):
A hazai burgonyanevelés helyzete, legújabb eredményei.
XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2012 március 6., plenáris
előadás, Összefoglalók: 13. o. ISBN 978-963-8351-38-8
- Cernák I., Decsi K., A. M. Gorji, R. Ahmadvand, Wolf I., Taller J., Polgar Zs. (2011):
Molekuláris markerek alkalmazása a burgonya biotikus stresszekkel szembeni
ellenállóságának javításában.
LIII. Georgikon Napok, Keszthely, 2011. szeptember 28-30. Kivonat-kötet 46. o.
ISBN 978-963-9639-43-0
- Polgar, Z., K. Decsi, I. Cernák, A. M. Gorji, I. Wolf (2011):
Molecular markering and mapping of a potato late blight resistance gene.
XVIII. Triennial Conference of the European Association for Potato Research.
Abstracts of Papers and Posters, pp. 203. (poster), July 24-29, 2011 Oulu, Finland
- Polgár Zs., Wolf I., Vaszily Zs., Tömösköziné Farkas R., Gergely L. (2011):
A biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni rezisztencianevelés legújabb
eredményei burgonyában.
XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2011 április 27., előadás,
Összefoglalók: 49. o. ISBN 978-963-08-1235-1
- Decsi K., Gorji A. M., Taller J., Cernák I., Wolf I., Polgár Zs. (2011):
Burgonya fitoftóra rezisztencia gén molekuláris markerezése és térképezése.
IX Magyar genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2011,
március 25-27, Siófok, Program összefoglalók 206-207. o. ISBN 978-963-88019-4-4
Poszter