

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola
Genetika program

Agrobacterium rezisztencia térképezése szőlőben

PhD értekezés

Kuczmog Anett

Témavezető:

Dr. Putnoky Péter

egyetemi tanár

PÉCS, 2012.

1. BEVEZETÉS

A patogén *Agrobacterium* fajok egyedülállóan rendelkeznek azzal a képességgel, hogy megfertőzzenek és a bennük lévő T-DNS segítségével genetikailag transzformáljanak számos kétszikű növényt. A növényi genomba beépülő DNS szakaszon lévő gének működésének következtében a növényi sejt szabályozatlanul termel hormonokat (auxin, citokinin), ami abnormális sejtosztódást, tumornövekedést (crown gall vagy koronagubacs) eredményez. E tünetekkel ezek a Gram-negatív talajbaktériumok jelentős károkat okoznak a gazdaságilag fontos ültetvényekben, mely komoly igényt támaszt a mezőgazdaságban a betegséggel szemben ellenálló, *Agrobacterium* vagy crown gall rezisztens fajták létrehozására.

A szőlő (*Vitis vinifera*) agrobaktériumos betegsége a világ minden táján előfordul. A fertőzött növények tünetmentesek mindaddig, amíg meg nem sérülnek fagyhatás, metszés, oltás vagy egyéb mechanikai hatás következtében. A sejtburjánzás következtében az edénnyaláb rendszer, aminek feladata a víz, a felvett tápanyagok és a fotoszintézis termékek szállítása, elveszíti szerkezetét és funkcióját, ami a növény meggyengüléséhez, súlyosabb esetben pedig az elpusztulásához vezethet.

A legkézenfekvőbb, hosszú távú megoldást a betegséggel szemben ellenálló, új fajták létrehozása jelentené. Bár a termesztett szőlőfajták védtelenek az *Agrobacterium* fertőzésekkel szemben, ismertek olyan *Vitis* fajok, mint a *V. amurensis* vagy a *V. labrusca*, melyeken nem képeznek tumort a patogén baktérium törzsek. Hazánkban a *V. amurensis* eredetű crown gall rezisztenciát sikerült keresztezéssel bejuttatni a borszőlőbe, még a genomikai kutatások kezdete előtt. Kimutatták, hogy ez a tulajdonság egy génes, domináns és mendeli módon öröklődik. A rezisztencia négy generáción keresztül (F1, F2, BC1, BC2) stabilan megmaradt és széles spektrumú védettséget biztosított a különböző patogén *A. vitis* és *A. tumefaciens* törzsekkel szemben.

Az elmúlt évtizedben a *Vitis* genomika is jelentős fejlődésen ment keresztül. Számos genetikai térkép készült el molekuláris markerek segítségével, hogy elősegítse a klasszikus nemesítési munkát (marker assisted selection) vagy a térképezésen alapuló génklónozást (mapped based cloning). Ezek segítségével olyan gazdaságilag is fontos tulajdonságok genetikai vizsgálata kezdődött el, mint a magvatlanság, a bogyó súly vagy a különböző kórokozókval szembeni rezisztencia. Nemrég a szőlő genom teljes szekvenciáját is meghatározták, ami nagyban elősegíti újabb markerek kifejlesztését és a génklónozást. Mindezek ellenére a *V. amurensis* eredetű rezisztenciagén genetikai térképezésére és izolálására eddig még nem került sor.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk hosszú távú célja a *V. amurensis* eredetű *Agrobacterium* rezisztencia (*RcgI*, crown gall resistance) lókusz helyzetének meghatározása, a gén izolálása és a rezisztencia genetikai, molekuláris növényélettani alapjainak feltárása. Ennek érdekében a következő kezdeti célokat tűztük ki magunk elé:

- Patogén *A. vitis* törzsek jellemzése, az auxin bioszintézisben szerepet játszó gén, *iaaH* (indole-3-acetamide hydrolase) DNS szekvenciái alapján, annak érdekében, hogy egymással nem közeli rokonságban lévő baktérium törzseket tudjunk a rezisztens szőlő növények, és az utódpopuláció egyedeinek vizsgálatához alkalmazni.
- A rezisztens *V. vinifera* Kunbarát és a fogékony Sárfehér fajták keresztezéséből származó nagyszámú utód jellemzése különböző *Agrobacterium* törzsekkel történő fertőzések segítségével.
- A rezisztencia lókusszal kapcsolt DNS markerek (RAPD, SSR) azonosítása, és kromoszómális helyzetének minél pontosabb meghatározása.
- SCAR markerek fejlesztése a rezisztenciához kapcsolt (RAPD) régiókra és célzott polimorfizmusok keresése az adatbázisokban elérhető genomikus szekvencia alapján.
- Az *RcgI* lókusz genetikai térképének elkészítése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3. 1. A vizsgálatok növényanyaga és az agrobaktérium fertőzési tesztek

Munkánkat egy *V. amurensis* eredetű *Agrobacterium* rezisztenciát hordozó BC2 hibridcsalád utódain végeztük. Közvetlen szülőként a rezisztens *Vitis* sp. Kunbarát fajtát (BC1) és a fertőzésre érzékeny, önbeporzásra képtelen *V. vinifera* Sárfehér fajtát használták fel. A keresztezésből származó 272 magoncot zölddugványozással szaporítottuk, és üvegházban, természetes megvilágítás mellett neveltük.

A térképező populáció egyedeinek *Agrobacterium* törzsekkel szembeni fogékonyságát mesterséges fertőzéssel határoztuk meg. Az *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* Tm4, AT1, S4 törzseket alkalmaztuk. A 4-6 leveles növények fiatal szárait három helyen szúrtuk át a baktérium szuszpenzióba mártott lándzsátű segítségével és 6 hét után értékeltük a tumorképződéseket. A fertőzési kísérleteket kétszer ismételtük meg, két egymást követő évben.

3. 2. Szőlő genomi DNS izolálás és genotipizálás

A DNS izolálás a növények fiatal leveleiből történt, és a PCR reakciókhoz a mintákból egyenlő koncentrációjú oldatokat hígítottunk. A DNS markerek keresését a szülők, öt rezisztens, illetve öt szenzitív egyedből származó DNS mintával külön-külön végeztük.

A rezisztenciagénhez kapcsolt markerek keresése során kétféle polimeráz láncreakció alapú (PCR) módszert alkalmaztunk, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) és SSR (Simple Sequence Repeat). A RAPD PCR reakciókat a dekamer primereket (Operon, Alameda, CA) egyesével, illetve párban alkalmazva végeztük. A tecMAAP PCR analízisek során restriktív endonukleázokkal (*EcoRI*, *PstI*, *HindIII*) hasított szőlő DNS mintákkal végeztük a PCR reakciókat. Az SSR analízisekhez már publikált *V. vinifera* referencia térképekből válogattunk markereket az egyes kapcsoltsági csoportokból. A primerek szekvenciája elérhető az NCBI UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisban. A polimorfizmust mutató markerek kapcsoltságának mértékét a teljes utódpopuláció vizsgálatával határoztuk meg.

3. 3. SCAR markerek fejlesztése

A célzott polimorfizmusok keresésére és a kapcsolt, meghatározott bázissorrendű régiókra specifikus primer párokat terveztünk. A polimorfizmust mutató RAPD fragmenteket a rezisztens szülői mintából izoláltuk és klónoztuk. A DNS szekvenciák meghatározását követően, a nukleotidsorrendek ismeretében azoknak a fragmenteknek a két végéhez közel terveztünk specifikus primereket, melyek hasonlóságot mutattak a Pinot Noir genom egyedi részeivel vagy kromoszóma lókuszaival. Az így tervezett primereket vizsgáltuk a szülői mintákon és az öt rezisztens és öt szenzitív kiválasztott utódon, hogy tényleg SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) primerként működnek-e, azaz képesek-e egy, a rezisztenciához kapcsolt specifikus fragmentet amplifikálni.

Az adatbázisokban elérhető Pinot Noir genom (8x és 12x WGS (Whole-Genome Shotgun)) és a 15. kromoszóma szekvenciája alapján, olyan primereket is terveztünk, melyek segítségével a szülői mintákból a megfelelő, elsősorban egyedi, intergenikus és intron szekvenciák amplifikálhatók és az előbb már említettek szerint vizsgáltuk őket.

3. 4. DNS technikák, bioinformatikai eszközök

Az alapvető DNS technikákat (emésztés restriktív enzimekkel, agaróz gélelektroforézis, ligálás, transzformálás, plazmid DNS izolálás) a standard módszerek szerint, valamint a

gyártó utasításait követve végeztük. A munkánk során tisztított plazmid DNS minták és PCR fragmentek nukleotid szekvenciáját a megfelelő oligonukleotidok segítségével az MTA határozták meg a BigDye terminátor kit alkalmazásával, Applied Biosystems 373A szekvenáló készüléken. A szekvenciák elemzésére az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vagy a GENOSCOPE (<http://www.genoscope.cns.fr>) honlapján elérhető *V. vinifera* genomprojekthez kapcsolt különböző funkciókat alkalmaztuk (BLAST). A specifikus primer párok tervezésénél a DNASTAR PrimerSelected és a PCR Primer Stats programot (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) alkalmaztuk.

3. 5. Kapcsoltsági analízis

A rezisztencia lókusszal szoros kapcsoltságot mutató markerek sorrendjét szintérképezés segítségével határoztuk meg. A genotípus adatokból kiszámítottuk a markerek közötti rekombinációs gyakoriságot és abból a becsült genetikai térképtávolságot. Ehhez a legegyszerűbb képletet (rekombinánsok száma/ összes utód x 100), a Kosambi térképfüggvényt alkalmaztuk.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. Az *Agrobacterium* rezisztencia szegregációja

A rezisztencia lókusz térképezésére irányuló munkánkhoz a térképező populációt az agrobaktérium rezisztens Kunbarát és érzékeny Sárféher fajták keresztezésével hoztuk létre. A 272 magonc *Agrobacterium* törzsekkel szembeni fogékonyságát mesterséges fertőzéssel határoztuk meg.

Munkánk kezdetén a két szülőt, és a keresztezésükből származó 27 magoncot fertőztünk *A. tumefaciens* C58, *A. vitis* Tm4, AT1 vagy S4 törzsekkel. Megállapítottuk, hogy a négy törzsszel történő fertőzés eredményei megegyeztek, ugyanazon növények klónjai mutatták a rezisztens vagy szenzitív fenotípust. Így a későbbiekben, a többi magonc esetében, már csak az *A. vitis* AT1 és Tm4 törzsszel végeztük el a fertőzési kísérleteket. A kiértékeléseket követően 153 utód bizonyult ellenállónak, míg 119 utód klónjain mindegyik baktérium törzs tumort hozott létre.

4. 2. RAPD kísérletek a szülői DNS polimorfizmusok azonosítására

A biológiai tesztekkel párhuzamosan a keresztezéshez szülőként használt Kunbarát és Sárféher fajták közötti DNS polimorfizmusokat határoztuk meg. A RAPD dekamer

primereket először egyesével alkalmaztuk, 520 dekamer primerrel végeztünk összehasonlításokat és ebből 232 esetben találtunk legalább egy mintázatbeli eltérést a két szőlőfajta között. A RAPD analízisek során a primereket páros kombinációban is alkalmaztuk, és a későbbiekben a DNS polimorfizmusok számát azzal próbáltuk meg tovább növelni, hogy a PCR reakciókat a genomi DNS minták restriktív endonukleázzal való emésztése előzte meg (tecMAAP). 1038 primer kombinációt használtunk a kísérletekben és 387 esetben fedeztünk fel további polimorfizmusra utaló eltérő mintázatot. A tecMAAP kísérletekben 1560 primert alkalmaztunk és ebből 497 esetben találtunk mintázatbeli eltérést. A RAPD vizsgálatok során 688 esetben kaptunk polimorfizmust a rezisztens Kunbarát esetében.

4. 3. Az *Agrobacterium* rezisztenciával kapcsolt RAPD és SCAR markerek

Az utódpopuláció agrobaktériumokkal szembeni rezisztenciára jellemzése után, a polimorfizmust mutató DNS markerek keresését öt rezisztens, illetve öt szenzitív egyedből származó DNS mintával külön-külön, a kapcsaltságot mutató markerek vizsgálatát a teljes utódpopuláción végeztük el. A 688 Kunbarát specifikus RAPD markert adó primer közül összesen kilenc primerrel tudtunk rezisztenciához kapcsolt polimorfizmust kimutatni.

A polimorfizmust mutató RAPD fragmenteket a rezisztens szülői mintából izoláltuk és klónoztuk. A DNS szekvenciák meghatározását követően az izolált fragmenteknél sajnos több különböző szekvenciát is kaptunk, így nem tudtuk mindegyik esetében meghatározni, hogy melyik köthető a polimorfizmushoz. Annak érdekében, hogy megállapíthassuk, hogy a különböző szekvenciák közül melyik kapcsolt a rezisztenciával, a nukleotidsorrend ismeretében specifikus (SCAR) primer párokat terveztünk és megvizsgáltuk a kiválasztott utódokon, hogy képesek-e egy, a rezisztenciához kapcsolt specifikus fragmentet amplifikálni. Összesen három SCAR markert (OPT17sc, OPQ15sc, OPX05sc) sikerült kialakítanunk és a teljes utódpopuláció vizsgálatával meghatároztuk, hogy kapcsoltak a rezisztenciával.

A fent említett vizsgálatokkal párhuzamosan megpróbáltuk az NCBI honlapján elérhető *V. vinifera* genomprojekthez kapcsolódó BLAST program segítségével meghatározni, hogy a rezisztenciával kapcsolt RAPD fragmentek melyik kromoszómán található. Az elemzésekből kiderült, hogy nagy részük vagy egyik Pinot Noir kromoszóma szekvenciájához sem illeszthető, vagy egyszerre több kromoszómán is előfordul. A szekvenciák kódoló kapacitásának további elemzéséből pedig kiderült, hogy repetitív vagy retrotranszpozon elemeket képviselnek.

4. 4. A rezisztenciával kapcsolt SSR markerek keresése

A DNS polimorfizmusok keresésére SSR markereket is vizsgáltunk. A 19 kapcsoltsági csoportot reprezentáló SSR marker közül választottunk néhány, egymástól távol eső markert. A 41 kiválasztott marker közül 20 segítségével sikerült különbséget kimutatnunk a szülőkből származó DNS mintákban. A továbbiakban öt rezisztens és öt szenzitív minta bevonásával ezek közül már csak egy markerrel (VVIV67) tudtunk kapcsoltságot kimutatni a vizsgált rezisztenciához. További utódok bevonásával történő vizsgálatának eredményéből kiderült, hogy a VVIV67 marker segítségével egy olyan egyedi szekvencia kapcsoltságát mutattuk ki az *Rcg1* rezisztencia lókuszhhoz, amely - legalább is a *V. vinifera* cv. Pinot Noir fajtában – biztosan a 15. kromoszómán helyezkedik el. További 15. kapcsoltsági csoportba tartozó specifikus SSR markerek tesztelésének eredményéből pedig később kiderült, hogy még kettő SSR, a VVS16 és UDV015, mutat szoros kapcsoltságot a rezisztenciával.

4. 5. Célzott polimorfizmus keresés a 15. kromoszóma mentén

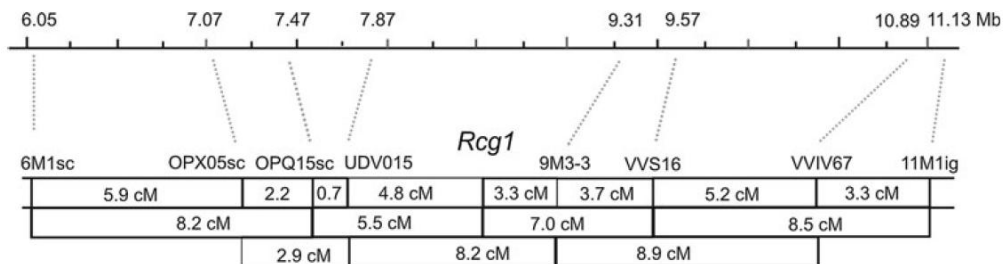
A kapcsolt markerek szekvenciái alapján azt feltételeztük, hogy az *Rcg1* lókuszt a 15. kromoszómán (4M – 12M) helyezkedhet el. Az adatbázisokban elérhető Pinot Noir 15. kromoszóma szekvenciája alapján, olyan primereket terveztünk, melyek segítségével a szülői mintákból az 1-2 kb nagyságú intron szekvenciák amplifikálhatók. Összesen 61 primer párt terveztünk a Pinot Noir 15. kromoszóma szekvenciája alapján, és azt vizsgáltuk, hogy egy adott szekvenciára tervezett primer pár eredményez-e azonnal Kunbarát specifikus, a rezisztencia térképezésében használható markert.

Ezzel a módszerrel, sikerült hét új SCAR markert létrehozni. Ezek közül négy működött olyan specifikus markerként (5M5, 9M3-3, 11M1ig, 12M3), hogy a rezisztenciát hordozó, további három (2M1D, 2M4E, 6M1) a rezisztenciát nem hordozó kromoszómához volt kapcsolt. A szorosan kapcsolt primerekkel (6M1sc, 9M3-3, 11M1ig) elvégeztük a teljes utódpopuláció vizsgálatát és megállapítottuk, hogy a legközelebbi markerünk 9M3-3, 3.3 cM távolságra helyezkedik el a rezisztenciagéntől.

4. 6. Az *Rcg1* lókuszt genetikai térképe

Munkánk során összesen 12 polimorfizmus kapcsoltságát igazoltuk az *Rcg1* lókuszt jelenlétével. A markerek sorrendjét szintérképezés segítségével és az egyes lókusztok közötti távolság meghatározásával állapítottuk meg (1. ábra). A térképen lévő markerek 29.1 cM távolságot fednek le az *Rcg1* lókuszt körül, mely a Pinot Noir genom szekvenciája szerint 5.08

Mb távolságnak felel meg. Amennyiben ez a hosszúság a *V. amurensis* szekvenciában nem tér el szignifikánsan a Pinot Noir szekvenciától, akkor kiszámolható, hogy 1 cM 171 kb távolságnak felel meg. Eszerint a legközelebbi markerünk (9M3-3) körülbelül 576 kb (3.3 cM) távolságra helyezkedhet el a rezisztenciagéntől.



1. ábra: Az *Rcg1* lókusszal kapcsolt markerek és köztük lévő rekombinációs térképtávolságok (cM). A koordináták megabázisban (Mb) mutatják a Pinot Noir szekvenciában (12x WGS) az egyes markerek feltételezett helyzetét.

Eddigi eredményeink még nem teszik lehetővé a klónozási munka megkezdését, de minden eddig térképezett marker segítségével már megvalósítható a markerhez kapcsolt szelekció a nemesítési munkákban.

5. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Munkánk során több *A. vitis* törzset jellemeztünk *iaaH* DNS szekvenciáik alapján és kiválasztottuk az egymástól eltérő szekvenciákat tartalmazó *A. vitis* Tm4 és AT1 törzseket a további munkára.
- Négy *Agrobacterium* törzs segítségével meghatároztuk a *V. vinifera* Kunbarát (rezisztens) és Sárfehér (fogékony) fajták keresztezéséből származó 272 utód ellenálló képességét.
- Három különböző módszer segítségével rezisztenciagénhez (*Rcg1*) kapcsolt markereket azonosítottunk. Először a lókusszal kapcsolt RAPD markereket kerestünk és segítségükkel a rezisztenciához kapcsolt SCAR markereket fejlesztettük ki. Ezzel párhuzamosan ismert SSR markerekkel bizonyítottuk és újabb SCAR markerek kifejlesztésével megerősítettük, hogy az *Rcg1* lókusz a 15. kromoszómán helyezkedik el.
- Sikerült az *Rcg1* régió nyolc markert tartalmazó genetikai térképét is megszerkeszteni, melyen a legközelebbi marker mintegy 3.3 cM (576 kb) távolságra helyezkedik el az *Rcg1* géntől.

PUBLIKÁCIÓK

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények jegyzéke

Bini, F., **Kuczmog, A.**, Putnoky, P., Otten, L., Batti, C., Burr, T.J., Szegedi, E. (2008) Novel pathogen-specific primers for the detection of *A. vitis* and *A. tumefaciens*. *Vitis* **47** (3): 181-189. (2008. IF:0,795)

Kuczmog, A., Galambos, A., Horváth, Sz., Mátai, A., Kozma, P., Szegedi, E., Putnoky, P. (2012) Mapping of crown gall resistance locus *Rcg1* in grapevine. *Theor Appl Genet* In press manuscript. DOI: 10.1007/s00122-012-1935-2. (2012. IF:3,36)

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: 4,155

A disszertáció témakörében készült konferencia előadások és poszterek jegyzéke

Kuczmog Anett, Galambos Anikó, Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2009) *Agrobacterium* rezisztencia térképezése szőlőben. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, Magyarország. PG28, poszter absztrakt.

Kuczmog Anett, Galambos Anikó, Horváth Szabina, Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2011) Az *AgrI Agrobacterium* rezisztencia lokusz térképezése szőlőben. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Magyarország. Program összefoglaló 45. old., előadás absztrakt.

Kuczmog Anett, Galambos Anikó, Kozma Pál, Szegedi Ernő, Putnoky Péter (2011) Az *AgrI Agrobacterium* rezisztencia lokusz térképezése szőlőben. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Magyarország. P093, poszter absztrakt.

Horváth Szabina, **Kuczmog Anett**, Putnoky Péter (2011) A 15. kromoszómához kapcsolt SCAR-markerek azonosítása szőlőben. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Magyarország. P050, poszter absztrakt.

Galambos Anikó, **Kuczmog Anett**, Putnoky Péter, Oláh Róbert, Szegedi Ernő (2011) Mesterséges *Agrobacterium* rezisztencia kialakítása szőlőben. IX. Magyar Genetikai Kongresszus, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, Magyarország. P064, poszter absztrakt.

Egyéb tudományos közlemények jegyzéke

Pluhár, Zs., Kocsis, M., **Kuczmog, A.**, Csete, S., Simkó, H., Sárosi, Sz., Molnár, P., Horváth Gy. (2012) Essential oil composition and preliminary molecular study of four hungarian *Thymus* species. *Acta Biol Hung* **63**(1): 81-96.(2010. IF:0,793)

Egyéb konferencia előadások és poszterek jegyzéke

Kocsis Marianna, **Kuczmog Anett**, Járomi Luca, Hoffmann Gyula, Putnoky Péter, Kozma Pál (2004) Lisztharmat rezisztenciával kapcsolt markerek kutatása RAPD analízissel. X. Magyar Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Magyarország. P121, poszter absztrakt.

Kuczmog Anett (2005) Lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt RAPD markerek jellemzése. XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia Szekció, Pécs, Magyarország. Program összefoglaló 116. old., előadás absztrakt. III. helyezés.

Kuczmog Anett, Kocsis Marianna, Hoffmann Gyula, Hoffmann Sarolta, Kozma Pál, Putnoky Péter (2005) Lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt DNS-markerek jellemzése szőlőben. XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Magyarország. Program összefoglaló 107. old., poszter absztrakt.

Kuczmog Anett, Kocsis Marianna, Hoffmann Gyula, Hoffmann Sarolta, Kozma Pál, Putnoky Péter (2005) Lisztharmat és peronoszpóra rezisztenciával kapcsolt DNS-markerek jellemzése szőlőben. VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, Magyarország, Program összefoglaló 166-167. old., poszter absztrakt.

Kuczmog Anett, Takács Attila, Kocsis Marianna, Kozma Pál, Putnoky Péter (2007) Lisztharmat rezisztenciával kapcsolt SCAR markerek szőlőben. VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, Magyarország. Program összefoglaló 102. old., poszter absztrakt.