



**Országos Tudományos Diákköri
Konferencia
2015**



**BURGONYA GENOTÍPUSOK X ÉS Y VÍRUS, VALAMINT
NEMATODA REZISZTENCIÁJÁNAK MARKER ALAPÚ
SZELEKCIÓJA**

Készítette: Esztergályos Ádám, I. évf. MSc.

Témavezető: Dr. Hoffmann Borbála tanszékvezető egyetemi docens

Pannon Egyetem Georgikon Kar, Növénytudományi és Biotechnológiai Tanszék

Társkonzulens: Dr. Cernák István tudományos munkatárs

Pannon Egyetem Burgonyakutatói Központ

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A burgonya jelentősége és morfológiája	3
2.2. A burgonya rendszertana, származása	4
2.3. A burgonya termesztése	5
2.4. A burgonya betegségei	5
2.4.1. A burgonya Y-vírus (PVY)	6
2.4.2. A burgonya Y-vírus rezisztencia	7
2.4.3. A burgonya X-vírus (PVX)	7
2.4.4. A burgonya X-vírus rezisztencia	9
2.4.5. Fonálféreg	9
2.4.6. Fonálféreg rezisztencia	10
2.5. Molekuláris markerek	10
2.5.1. DNS-izolálás	11
2.5.2. Gélelektroforézis	12
2.5.3. PCR elve és lépései	13
2.5.4. Markerezési módszerek	14
2.5.5. Marker alapú szelekció	18
3. Saját vizsgálatok	18
3.1. Anyag és módszer	18
3.1.1. A vizsgálatok növényanyaga	19
3.1.2. DNS tisztítás	21
3.1.3. PCR	21
3.1.4. Gélelektroforézis, gél dokumentáció	22
3.2. Eredmények és értékelésük	23
3.2.1. PVY	23
3.2.2. PVX	24
3.2.3. Fonálféreg	25
4. Összefoglalás	26
5. Köszönetnyilvánítás	28
Felhasznált irodalom	28

1. Bevezetés

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) az egyik legértékesebb kultúrnövényünk. Gumója gazdag beltartalmi összetételénél fogva népelelmezési szempontból nagyon fontos. Ugyanakkor állati takarmányozásra, élelmiszer- és egyéb ipari (keményítő, szeszgyártás) felhasználásra egyaránt alkalmas, mindemellett gyógyszeripari nyersanyag (HORVÁTH, 2003).

Hazánkban az éghajlati és talajadottságok nem kedvezőek a burgonyatermesztés számára (TAS, 1997). Azonban a termésátlagok annál is alacsonyabbak, mint amit az ökológiai adottságaink lehetővé tennének. Ennek fő oka a növények nem megfelelő egészségi állapota. A beteg növény asszimilációs képessége kisebb, légzése fokozott, ezáltal csökken a termés mennyisége és romlik minősége is (POLGÁR et al., 2014). A legnagyobb kockázatot a vírusok jelentik, hiszen a vírusbetegségek terjedésének következtében a terméskiesés gyakran eléri a 30%-ot. Hazánkban a burgonyát fertőző mintegy 40 vírus közül a legjelentősebbek a burgonya Y (PVY), és burgonya levélsodródás (PLRV) vírusok. A legolcsóbb és leghatékonyabb védekezési mód ellenálló fajták termesztése (POLGÁR et al., 2013).

Burgonyatermesztésünk elsődleges célja a hazai fogyasztás kielégítése. Mivel az étkezési burgonya vetésterülete csökkenő tendenciát mutat, így ez csak növekvő termésátlaggal érhető el. Ehhez a megfelelő agrotechnika alkalmazásán felül olyan fajták nemesítése szükséges, amelyek biotikus és abiotikus stresszekkel szemben ellenállóak, ugyanakkor beltartalmi értékük és termőképességük megfelelő. Ezzel növelhető a termelés biztonsága és gazdaságossága (HORVÁTH, 1995).

Magyarországon az 1970-es évek eleje óta a hazai fajták termelése csak kis területen folyt. A külföldi fajták szaporítása a szaporító terület kb. 92%-át foglalták el (KRUPPA, 2004). Mára a szaporító terület kb. 25%-án keszthelyi fajták vannak, az étkezési termőterületből pedig kb. 18-20%-ot foglalnak el (POLGÁR, 2012, A) Továbbra is szükség van a hazai kiváló rezisztencia tulajdonsággal bíró fajták népszerűsítése a termelők körében (KRUPPA, 2004).

A keszthelyi Burgonyakutatói Központban rendelkezésre álló kiváló minőségű fajták immunisak a burgonya Y és A vírussal szemben, rezisztensek a levélsodródás (PLRV) vírussal szemben. Emellett a forgalomban lévő 13 fajtából 4 immunis a burgonya X vírussal szemben, 9-9 pedig fonálféreg és burgonyarák rezisztens, 2 fajta a burgonyavésszel (fitoftóra) szemben is magas fokon ellenálló. Mindez a burgonyatermesztés gazdaságosságának és biztonságának növekedését eredményezi (CERNÁK, 2008).

A rezisztencia tulajdonságokat felhasználva a nemesítés napjainkban is folyamatosan zajlik. A Burgonyakutatói Központban a keresztezéssel létrehozott szülőpartnerek nem mindegyike tartalmazza a fontos, illetve kívánt rezisztencia tulajdonságot. A keresztezésekhez a szülőpartner kiválasztásakor ismerni kell a szülői genotípus tulajdonságait, később pedig a hasadó populációkban fontos a fogékony egyedek hatékony kisselektálása a programból. Mivel a növények felnevelése, hagyományos rezisztencia tesztje pénz és időigényes, karantén kórokozók esetén pedig nem kivitelezhető, olyan gyors és megbízható módszert kellett találni, amellyel a kívánt tulajdonság a növény felnevelése nélkül is nyomon követhető. A molekuláris markerek a DNS meghatározott szakaszai, amelyek alkalmasak a genotípusok közti különbségtételre (BENYÓNÉ, 2013). A marker alapú szelekció (MAS) használatával a genotípusok hagyományos, hosszas tesztelése helyett elég csak a szelektálni kívánt tulajdonsággal kapcsolt markert megvizsgálni. Ezáltal következtetni lehet arra, hogy az adott genotípus hordozza-e a kívánt jelleget (PEPÓ, 2010). A keszthelyi nemesítési programban fontos szerepet játszó, egyes rezisztenciagének térképezése, illetve a kapcsoltan elhelyezkedő markerek azonosítása megtörtént, a marker alapú szelekció gyakorlati alkalmazhatósága és megbízhatósága burgonya esetén már bizonyított (CERNÁK, 2008, AHMADVAND, 2013). Jelen vizsgálatunk célja a Központ génbanki gyűjteményében lévő, egyes szülői vonalak és fajták rezisztencia viszonyainak jellemzése volt molekuláris markerek segítségével. Vizsgálatunkban 14 fajtát teszteltünk: Snowden, Kastia, Laura, Lavina, Marabel, Murato, Sante, Aladin, Mindenes, Sárvári Piroska, Sárvári Rubinka, Sárvári Rózsa, Sárvári Borostyán, Albatros. A burgonya Y, X vírussal, illetve fonálféreggel szemben rezisztens genotípusokat, illetve a genotípusokban e rezisztenciákért felelős géneket kerestük. A keresett gének: R_{ysto} (PVY), R_{xaci} , R_{xadg} (PVX), illetve H1 (fonálféreg). Reményeink szerint jelen kutatás eredményeivel hozzájárulhatunk a nemesítők munkájához, lecsökkentve a kiváló rezisztencia tulajdonságokkal bíró, új fajták előállításának idejét.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A burgonya jelentősége és morfológiája

A termesztett burgonya az egyik legértékesebb népelelmezési cikkünk. Magas keményítőtartalmú, jó biológiai értékű fehérjét tartalmazó táplálék (KRUPPA, 2004). Szárazanyag tartalmának mintegy 80%-a szénhidrát, így jelentős mennyiségű energiát biztosít, ellenben zsírokat alig tartalmaz. Fehérjetartalma viszonylag alacsony, de az egy hektárra vonatkoztatott fehérjehozama megközelíti a hüvelyes növényekét, ugyanakkor az összes esszenciális aminosavat tartalmazza (HORVÁTH, 2004). Táplálkozásbiológiai szempontból is kiemelendő, vitamintartalma magas, C-, B₁-, B₂-, B₆-, A- és K-vitamint tartalmaz elsősorban (KOHÁRY, 2003). Ásványi anyag tartalma jelentős, fontos kálium-, kalcium-, foszfor- és vasforrás. Gazdag beltartalmi összetétele miatt a legfontosabb nagy mennyiségben fogyasztott táplálékunk (HORVÁTH, 2003). Mindemellett keményítő- és szeszipari nyersanyag. 100 kg burgonyából 10-15 l abszolút alkohol, vagy 17-18 kg keményítő állítható elő, amelyet aztán számos iparág hasznosít, de más ipari célú felhasználása is jelentős, pl. festék és papírgyártás, lebomló műanyagok (KRUPPA, 2004).

A *Solanum tuberosum* L. lágyszárú, bár eredeti élőhelyén fásodik. Magassága akár az 1 m-t is elérheti. Szára csaknem minden fajtánál bordázott, szőrözött (LÁNG, 1961). Levelei összetettek, páratlanul, félbe szárnyaltak, szórt állásúak. A rózsahéjú fajták levélnyele rendszerint pigmentált. Virágzata a szár csúcsán fejlődik, szerkezete bogernyő. A virágok kétivarúak, a szíromlevelek színe fajtabélyeg, fehértől a liláig változhat. Termése bogyó, amely alakja gömbölyű, zöld színű, gyakran pigmentált (LÖNHÁRD, 1979). Az ehető része a gumó, amely földalatti szármódosulás. Alaktanilag ággumó, a sztóló megvastagodása révén fejlődik. A gumó héjának színe a halványsárgától a liláig terjed. A gumóhús színe általában fehér, vagy halványsárga, de néhány, az Andokban honos fajtáé, illetve újabb nemesítésű, ínycsekeknek szánt fajtáé lila is lehet. Mivel a gumó hajtás eredetű, ezért rügyek találhatók rajta, ebből új növény fejlődhet (KRUPPA, 2004). A gyakorlatban ezt a tulajdonságát kihasználva vegetatív úton történik a szaporítása, de már kidolgozták a botanikai magról történő termesztés rendszerét is (HORVÁTH, 2003).

2.2. A burgonya rendszertana, származása

A termesztett burgonya (*Solanum tuberosum* L.) a paradicsommal (*Lycopersicon esculentum* L.), paprikával (*Capsicum annuum* L.), dohánynal (*Nicotiana tabacum* L.) és számos jelentős kultúrnövénnyel együtt a *Solanaceae* családba tartozik. A *Solanum* nemzetség népes, száznál több fajt számlál. A nemzetségen belül a *Tuberosa* subsectióba tartoznak a termesztett burgonyák, összesen 38 fajt sorolnak ide (KRUPPA, 2004). Ezeknek a burgonyanemesítésben jelentős szerepük van, elsősorban rezisztenciaforrások. Például a *S. phureja* a haploidizáció során alkalmazott faj, a *S. brevidens*, *S. etuberosum*, *S. bulbocastanum*, *S. berthaultii*, *S. stoloniferum* fajok pedig a rezisztencia nemesítés szempontjából jelentősek (POLGÁR, 2005). A fajok Közép- és Dél-Amerikából származnak, géncentrumaik Mexikóban, Kolumbiában, Ecuadorban, Peruban, Chilében és Bolíviában találhatók (BOCZ, 1992). A termesztett burgonya testvérfajai (vadburgonyák) még ma is megtalálhatóak a géncentrumokban, ahol egy részük gyomnövényként fordul elő (BERTSCH, 1949).

A burgonyát a XVI. században hozták be Európába spanyol hódítók (HERMANOVA et al., 2007). Mivel kedvelte a hűvös, csapadékos klímát, eleinte Európa északi országaiban terjedt. (HORVÁTH, 2003). Kiemelkedő jelentőségű, hogy a 18. század közepétől sikerült a rövidnappalra adaptálódott populációból nappal-semleges klónokat szelektálni, így a gumóhozamot megnövelni (DOBRÁNSZKI, MAGYARNÉ, 2005).

Hazánkba az 1650-es években hozták be német egyetemeken tanuló diákok. Terjedését gátolta, hogy maga a növény magas alkaloid tartalmú volt, így szántóföldi termesztésére csak 1780-ban került sor Rákoskeresztúron (BEKE, 1930). Az első hazai nemesítésű fajta a Magyar Kincs, amely Angelli József nevéhez köthető. Sárvári István 1962-ben alapozta meg Keszthelyen a vírusrezisztencia nemesítést. Az ő nemesítési alapanyagaira támaszkodva állították elő Lönhárd Miklós irányításával a '90-es évek közepén az első keszthelyi vírusrezisztens fajtákat (Hópehely, White Lady, Góliát stb.) (KRUPPA, 2004). Az olyan legújabb fajták pedig, mint a Balatoni Rózsa, Katica és Démon, melyek a 2000-es évek második felében kaptak állami minősítést, termőképesség és minőség tekintetében is versenyképesek a külföldi fajtákkal, rezisztencia tekintetében pedig messze felülmúlják azokat (POLGÁR és WOLF, 2013).

2.3. A burgonya termesztése

A Világon a betakarított termés mennyisége 368,4 millió tonna, ezzel az ötödik legfontosabb szántóföldi növény a cukornád (1773,8 millió t), a kukorica (875,1 millió t), a rizs (718,3 millió t), és a búza (674,9 millió t) után. A termőterület 19,3 millió ha, a termésátlag 19 t/ha (FAO, 2013).

Hazánkban az egy főre jutó fogyasztás sajnos csökkenő tendenciát mutat. Míg az 1930-as években 130 kg/fő/év volt jellemző, addig napjainkra ez az érték 60-65 kg/fő/év-re esett vissza (BOCZ, 1992). 2013-ban a fogyasztás 63,5 kg/fő/év volt, 2 kilogrammal magasabb az előző öt év átlagához képest, ugyanakkor 3 kilogrammal alacsonyabb 2005-höz képest (KSH, 2013). A burgonya vetésterülete szintén csökkenő tendenciát mutat. Míg a '30-as években 290000 ha volt, addig a '90-es évekre 44000 ha-nyi területet foglalt el. 2012-ben 25100 ha, míg 2013-ban 20300 ha volt (BOCZ, 1992, EUROSTAT, 2013).

2.4. A burgonya betegségei

Hazánkban az éghajlati és talajadottságok nem kedvezőek a burgonyatermesztés számára (TAS, 1997). Ettől függetlenül a termésátlagok alacsonyabbak, mint amit az ökológiai adottságaink lehetővé tennének. Ennek fő oka a növények nem megfelelő egészségi állapota. A beteg növény asszimilációs képessége ugyanis kisebb, ezáltal csökken a termés mennyisége és romlik minősége is (LÖNHÁRD, 1997). Hazánkban, főképp a vírusbetegségek terjedése következtében a termés kiesés gyakran eléri a 30%-ot (POLGÁR et al., 2013).

Burgonyatermesztésünk elsődleges célja a hazai fogyasztás kielégítése. Ez az egyre kisebb vetésterületen csak növekvő termésátlaggal érhető el. Így a megfelelő agrotechnika alkalmazásán felül olyan fajták nemesítése válik szükségessé, amelyek biotikus és abiotikus stresszekkel szemben ellenállóak, beltartalmi értékeik és termőképességük megfelelő. Ezzel növelhető a termelés biztonsága és gazdaságossága (POLGÁR, 2012, B).

Magyarországon a burgonya termesztése szempontjából a vírusok, illetve a burgonyavész (*Phytophthora infestans*) jelentik a legnagyobb kockázatot (CERNÁK, 2008). Hazánkban a burgonyát fertőző mintegy 30 vírus közül a legjelentősebbek a burgonya Y-vírus (potato Y *potyvirus*, PVY), burgonya levélsodródás vírus (potato leafroll *polerovirus*, PLRV), burgonya X-vírus (potato X *potexvirus*, PVX), burgonya S-vírus (potato S *carlavirus*, PVS), burgonya M-vírus (potato M *carlavirus*, PVM), burgonya A-vírus (potato A *potyvirus*, PVA), illetve a dohány rattle vírus (tobacco rattle *tobravirus*) (GÁBORJÁNYI et al., 1999).

2.4.1. A burgonya Y-vírus (PVY)

A PVY évről évre egyre gyakrabban fordul elő, a fogékony fajtákban minden évben járványt okoz. A fertőzés a tenyészidő végére elérheti a 80%-ot is (LÖNHÁRD, 1997).

Rendszertanilag a *Potyviridae* család *Potyvirus* nemzetségébe tartozik (HORVÁTH, 1999). A tünetek alapján több törzstípus különíthető el:

A leggyakrabban előforduló a közönséges, vagy normál törzs, a PYV⁰. A fertőzés jellemző tünetei a mozaikfoltosodás, és az apró, nekrotikus léziók megjelenése a levél fonákán. A beteg levelek a szárról nem esnek le, de könnyen letöredeznek (GÁBORJÁNYI et al., 1999).

A nekrotikus törzs (PVY^N) a leveleken enyhe tüneteket idéz elő, mozaikosságot, vagy halvány foltosságot okoz, dohányon azonban érnekrózt idéz elő (HORVÁTH, 1995).

A burgonya Y^{NTN} (PVY^{NTN}) a vírus legújabb, eddigi legagresszívabb törzse. A gumón tipikus tünet megjelenését váltja ki, felszíni nekrotikus gyűrűk formájában. Egyes burgonyafajtákon szár-, levél- és bogyóernekrózt okoz (KRUPPA, 2004).

A PVY^C törzs levéltetvekkel nem terjed, mivel a helper komponenseket elvesztette. A fertőzést *Nc* rezisztenciagén jelenlétében hiperszenzitív reakció legyőzi (GÁBORJÁNYI et al., 1999).

Ezen kívül újabb variánsokat is azonosítottak: PVY^{NW}, illetve PVY^Z. Ezek dohányban érnekrózt okoznak, azonban a PYV⁰ törzsre jellemző köpenyfehérje génnel rendelkeznek (CERNÁK, 2008). Kiemelendő azonban, hogy a tünetek és a termés csökkenés mértéke a burgonyafajtától és többszörös fertőzés esetén a vírustörzsek egymással való kölcsönhatásától függ (LÖNHÁRD, 1997).

A virion fonál alakú, egyszálú lineáris RNS-t tartalmaz. 730 nm hosszú és 11 nm széles, 5% nukleinsavat és 95% fehérjét tartalmaz (HORVÁTH, 1995). Mechanikailag könnyen átvihető, terjesztésében a levéltetvek (leggyakrabban az őszibarack-levéltetű (*Myzus persicae*)) játszanak döntő szerepet. Az átvitel nem perzisztens úton történik, így a vektor azonnal fertőzőképes, nincs lappangási idő (CERNÁK, 2008). Mivel hazánk klímája kedvez a levéltetveknek, a szaporodásuk gyors, ezért egyedszámuk nagy, így a betegség terjedése nagyon intenzív.

Kémiai védekezés a vírus kártétele ellen a vektorok számának csökkentésével lehetséges, de nehéz. A legolcsóbb és leghatékonyabb védekezési mód ellenálló fajták termesztése, fogékony fajták termesztése esetén pedig vírusmentes szaporítóanyag használata. A *Solanum stoloniferum* faj rezisztens a vírussal szemben. Valamennyi keszthelyi nemesítésű fajta az e

fajból származó Ry_{sto} rezisztenciagént hordozza, ezáltal gyakorlatilag immunis az Y vírus fertőzésével szemben (LÖNHÁRD, 1997).

2.4.2. A burgonya Y-vírus rezisztencia

A rezisztenciára nemesítés fő iránya az N és R gének bevitelén alapul (GÁBORJÁNYI et al., 1999). Az N gének által kontrollált hiperszenzitív reakció nyomán gyors lokális nekrosis fejlődik ki, ami a kórokozó lokalizálását eredményezi. A leválasztó szövetréteggel rendelkező növényfajoknál a levelek lehullnak. Mindez azt eredményezi, hogy a növény nem fertőzött részei egészségesek maradnak (CERNÁK, 2008).

Az Ny gén expressziója változó, vírustörzstől nagymértékben függ. Ellenben az Ry gén stabil, nem vírustörzs specifikus, dominánsan öröklődik (GÁBORJÁNYI et al., 1999). Az R gének által szabályozott extrém rezisztencia (ER) lényege, hogy a fertőzés korai szakaszában a vírus replikációjának gátlása következtében a vírus koncentrációja alacsony marad (KANG et al., 2005). Az extrém rezisztenciát adó gént a *Solanum stoloniferum* (Ry_{sto}) és *S. tuberosum* ssp. *andigena* (Ry_{adg}) vadburgonyában találták meg. A Ry_{sto} extrém rezisztenciát ad a burgonya A-vírussal szemben is, míg a Ry_{adg} csak a burgonya Y-vírussal szemben. További rezisztenciagének vannak a *S. houghashi* (Ry_{hou}), *S. vernei*, *S. pinnatisectum*, *S. polytrichon*, *S. simplicifolium*, *S. tuberosum* (N_{tbr}), *S. chacoense* (Ny_{chc} , Ry_{chc}), *S. acaule*, *S. demissum* (Ny_{dms}), *S. phureja* növényfajokban. A Ry_{hou} extrém rezisztenciát biztosít PVY és PVA vírusokkal szemben egyaránt (GÁBORJÁNYI et al., 1999). A *Solanum stoloniferum* fajban több rezisztencia gént is azonosítottak. A Ry_{sto}^{na} és Ry_{sto}^{rna} extrém rezisztenciát biztosítanak PVY, illetve hiperszenzitív reakciót PVA vírussal szemben. A Ry_{sto}^{n1} és Ry_{sto}^{n2} gének PVY vírussal szemben biztosítanak hiperszenzitív reakciót (CERNÁK, 2008).

2.4.3. A burgonya X-vírus (PVX)

A kórokozó minden burgonyatermesztő országban előfordul. Tünetei gyengék, de más vírusokkal együtt a kártétel lényegesen súlyosabb. A termés kiesés fajtától, vírustörzstől és a körülményektől függően 5-20% is lehet (ADAMS et al., 2004).

Rendszertanilag a *Barnaviridae* család *Potexvirus* nemzetségébe tartozik (HORVÁTH, 1999). Több törzse ismert, de a burgonyán okozott tüneteiben nem mutatnak olyan nagy változatosságot, mint az Y-vírus esetében (LÖNHÁRD, 1997). A vírusrezisztenciát nyújtó gének: Nb , Nx , Rx_{acl} , és Rx_{adg} . A vírustörzsek csoportosítása a szerint történik, hogy mely

rezisztenciagéneket képesek áttörni (GÁBORJÁNYI et al., 1999). A rendszerezést az **1. táblázat** mutatja.

1. táblázat: A burgonya X-vírus törzsek csoportosítása (Foxe, 1992)

Gén	Törzstípus			
	1	2	3	4
<i>nxnb</i>	+	+	+	+
<i>Nxnb</i>	-	+	-	+
<i>nxNb</i>	-	-	-	+
<i>NxNb</i>	-	-	-	+
<i>Rx</i>	-	-	-	-

+ : fogékony, - : rezisztens

Látható, hogy az *Rx* gén mindegyik vírustörzs ellen hatásos (kivéve a HB bolíviai törzs). A rezisztencia géneket már több fajtába sikeresen beépítették. Leggyakoribbak a 3., legritkábbak a 4. csoportba tartozó vírustörzsek. Nagy jelentősége van a vírustörzs csoportok földrajzi elhelyezkedésének is (VALKONEN et al., 1994).

A PVX fertőzés tünetei olyan enyhék, hogy csak bizonytalanul ismerhetők fel, különösen a mi melegebb, szárazabb klímánkon. A fertőzött növényen enyhe mozaikosodás figyelhető meg, főképp a levélerek között. Vizuális észlelés hiányában a vírus jelentősen elszaporodhat az állományban anélkül, hogy észrevennénk (HORVÁTH, 1995).

A virion fonál alakú, hajlékony, egyszálú lineáris RNS-t tartalmaz. 515 nm hosszú, 13 nm átmérőjű, 6% nukleinsavat és 94% fehérjét tartalmaz (HORVÁTH, 1999). Átvitele mechanikai úton történik, levéltetvek által történő terjesztése nem jelentős. Az átvitelben a beteg növény gyökerei, illetve a *Synchytrium endobiotikum* gomba zoospórái is részt vesznek (HORVÁTH, 1995).

Legeredményesebben rezisztens fajták használatával lehet védekezni. A fogékony fajták esetében a vírusmentes szaporítóanyag használata szinte teljes védelmet biztosít (LÖNHÁRD, 1997).

2.4.4. A burgonya X-vírus rezisztencia

A *Solanum acaule* és *S. tuberosum* L. ssp. *andigena* rezisztensek a vírussal szemben, a rezisztencia géneket felhasználva ma már számos külföldi és hazai rezisztens fajtát nemesítettek. A nemesítésben két extrém rezisztenciát biztosító gént használnak a rezisztencia kialakításához, melyeket a különböző vad *Solanum* fajok eltérő kromoszómáiból (XII. és V.) izoláltak (BENDAHDANE et al., 1999).

A két gén a *S. tuberosum* L. ssp. *andigena* fajból származó $R_{x_{adg}}=R_{x_1}$, illetve a *Solanum acaule* fajból származó $R_{x_{acl}}=R_{x_2}$. Szekvenciájuk 95%-ban megegyezik, csupán 40 aminosavban térnek el egymástól. Érdekes, hogy a R_{x_2} gén által kódolt fehérje nagy hasonlóságot mutat a *Globodera pallida* rezisztenciáért felelős R_{xhl} gén termékével is (AHMADVAND et al., 2012).

2.4.5. Fonálféreg

A fonálféreg fajok által okozott gazdasági kár nagyon jelentős lehet. Sajnos világszerte elterjedt kártevő, az erősen fertőzött területeken 90% is lehet a termés kiesés. Gyenge fertőzöttség is veszélyes a másodlagos fertőzések miatt (LÖNHÁRD, 1997).

Rendszertanilag a *Tylenchida* rend *Heteroderidae* család *Heterodera* nembe tartoznak (JÁVOR, 1963). A fertőzés következtében a növények fejlődése foltokban lemarad, gyengék, sárgulnak. Az alsó levelek leszáradnak, a csúcslevelek sodródni (LÖNHÁRD, 1997). A fonálféreg a gyökérből táplálkozik, ennek következtében a gyökérzet részben elhal, elveszti funkcióját. A sebfelületek kaput nyitnak a baktériumos, gombás fertőzéseknek is (FERRIS, 2008).

A kártevő 30 mikrométer hosszú, szabad szemmel nem látható. A nőivarú egyed megtermékenyítés után cisztává alakul, a feji rész a gyökérben marad, míg a hátsó rész 100 mikrométerre is duzzadhat. Ez tartalmazza a tojásokat. A ciszta ellenálló, 4-5 évig is életképes maradhat (JÁVOR, 1963). Terjedése a talajban gyors, talajjal, gépekkel illetve vetőgumóval nagy távolságokra eljuthat (NAPPO, 2007).

A kártevő elleni védekezés történhet egyrészt nematicidekkel. Ennek kijuttatása költséges, mivel célgépet igényel, a növényvédő szert ugyanis a talajba kell injektálni. Jelentősen csökkenthető az egyedszám vetésváltás alkalmazásával, ha legalább négy évig nem kerül a területre gazdanövény. Sajnos a *Solanaceae* családba tartozó gyomok (pl. *Solanum nigrum*) is gazdanövények, így a vetésváltás nem minden esetben sikeres (LÖNHÁRD, 1997). A leghatékonyabb védekezési mód rezisztens fajták termesztése.

2.4.6. Fonálféreg rezisztencia

A rezisztencia abban nyilvánul meg, hogy a burgonya gyökérexkrétuma serkenti a fonálféreg cisztából való kibújását, viszont ezek cisztát már nem képeznek. A lárvák ugyan behatolnak a gyökérbe, de nem tudnak tovább fejlődni (REINMUTH, 1955). A rezisztencia kialakításában két diploid vad fajt, a *Solanum vernei*-t és *S. spegazzinii*-t, illetve a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* fajt használták fel a keresztezéshez (ROGOZINA, KIRU, 2005). A molekuláris genetikai módszerek fejlődésével számos, a rezisztencia kialakításában résztvevő gént térképeztek fel. Elsők között volt a dominánsan öröklődő *Gro1* gén, amelyet RFLP marker segítségével térképeztek. Rezisztenciát biztosít az összes ismert *G. rostochiensis* patotípus ellen (Ro_1 , Ro_2 , Ro_3 , Ro_4 és Ro_5), a VII. kromoszómán helyezkedik el (GEBHARDT, VALKONEN, 2001). Egy másik jelentős dominánsan öröklődő gén a *H1*, amely hiperszenzitív rezisztenciát biztosít a *G. rostochiensis* Ro_1 és Ro_4 patotípusa ellen. A *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* fajból származik, az V. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el, és szorosan kapcsolódik a *CP113* és *CD78* RFLP markerekkel (BIRYUKOVA et al., 2008).

2.5. Molekuláris markerek

A markernek az a szerepe, hogy megjelölje, „láthatóvá” tegye a keresett tulajdonságért felelős gént. A **genetikai markerek** tulajdonságokat meghatározó allélek. Sajátosságukat vizsgálhatjuk DNS, fehérje és fenotípus szintjén egyaránt (BISZTRAY, 2001). Alkalmazásuk már a XX. sz. elejétől felmerült, Sax 1923-ban a bab maghéj színének öröklődése alapján termésméretre szelektált, Chase 1952-ben haploidok kiválogatására antocián marker gént használt (SUTKA, 2004).

A **morfológiai markerek**, mint például a virág, illetve a termés színe, könnyen azonosíthatók, azonban használatuk hátránya, hogy a génkölsönhatások és bizonyos esetekben a környezet nagymértékben befolyásolhatja a megjelenésüket (CERNÁK, 2008).

A **biokémiai markerek** (fehérjék, szénhidrátok, lipidek) eltérő allélek megjelenési formái, azonban detektálásuk bonyolultabb, analitikai, laboratóriumi módszereket igényel. Hasonlóan a morfológiai markerekhez, a biokémiai markerek is érzékenyek a környezeti hatásokra, valamint expressziójuk fejlődési stádiumtól is függ (KISS, 2005).

A **molekuláris markerek** a DNS meghatározott szakaszai, amelyek alkalmasak a genotípusok közti különbségtételre. Ezek a szakaszok nem jelennek meg minden esetben fenotípusosan, mivel gyakran a DNS nem kódoló szakaszaiban találhatók. A DNS-markerek függetlenek a környezeti tényezőktől, az egyed korától, fejlettségétől. Az ideális marker a következő

paramétereknek felel meg: nagyfokú polimorfizmus kimutatására alkalmas, gyakran, és a teljes genomban előfordul (egyenletes), könnyen és gyorsan vizsgálható, vizsgálata jól reprodukálható. A különböző laboratóriumokban elvégzett munkák eredményei könnyen összehasonlíthatók, és fejlesztésük, illetve használatuk nem túl költségigényes (BENYÓNÉ, 2013).

2.5.1. DNS-izolálás

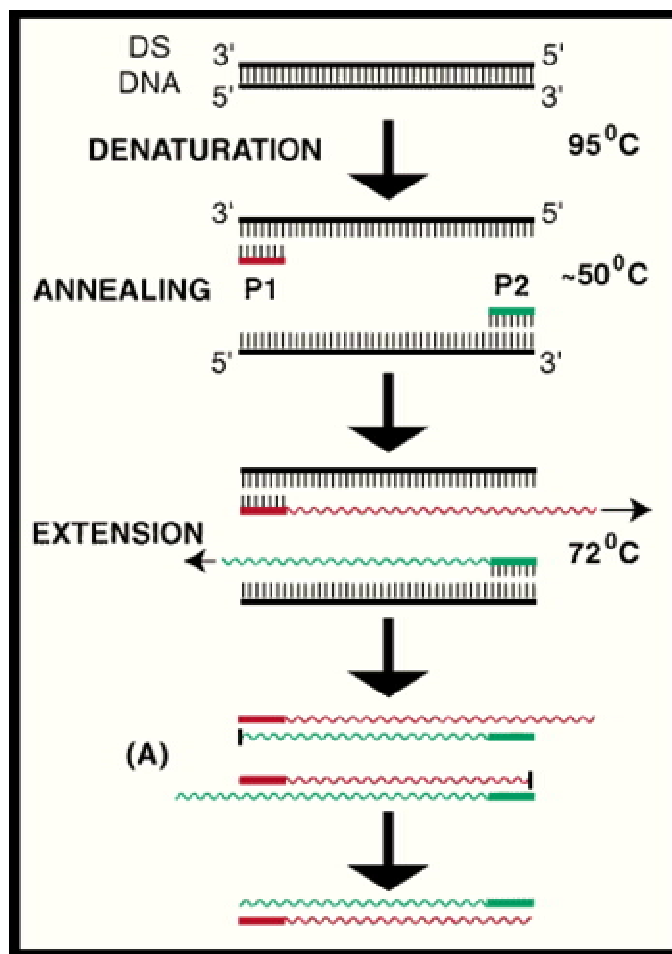
A növényi sejtekből nem könnyű a DNS-t kinyerni, ami főképp a sejtfalnak, illetve a sejtekben felhalmozott másodlagos anyagcseretermékeknek köszönhető (SUTKA, 2004). A DNS-izolálás általában a következő lépésekből áll:

1. **Sejtek feltárása, roncsolása.** Általában fagyasztással történik, folyékony nitrogénben, de lehet őrléssel, homogenizátorral is. A hidegen tartás kedvező, mert csökkenti a DNS bontó nukleázok aktivitását.
 2. **Szuszpendálás pufferrel.** A puffer tartalmaz EDTA-t (etiléndiamin-tetraecetsav), ami a feltárt sejtekből kiszabadult DN-ázok lekötéséhez kell, továbbá detergenset, amelyek szolubilizálják a lipidmembránokat, illetve kicsapják a fehérjéket.
 3. **Az oldható frakció eltávolítása** a roncsolt sejtalkotóktól, illetve az el nem roncsolt sejtektől centrifugálással.
 4. **A fehérjék eltávolítása.** Általában szerves oldószerekkel történik (fenol-kloroform és izoamilalkohol).
 5. **RNS eltávolítása** RN-ázzal, fenol extrakció.
 6. **A DNS kicsapása** etanollal, vagy izopropanollal. Mindig alacsonyabb koncentrációban lévő, egyenértékű kationok jelenlétében történik (nátrium-, vagy ammónium-acetát).
 7. **Centrifugálás**, majd a DNS oldása desztillált vízben, vagy puffer oldatban (KISS, 1999).
- A DNS koncentrációjának meghatározása spektrofotometriával történik. A mérés alapja, hogy a heterociklusos bázisok elnyelési maximuma 260 nm-en van. Egységnyi abszorpció 50 µg/ml DNS-nek felel meg (BENYÓNÉ, 2013).

2.5.2. Gélelektroforézis

A gélelektroforézis a nukleinsavak elválasztását, méretének meghatározását teszi lehetővé. A módszer lényege, hogy a töltéssel rendelkező molekulák elektromos térben a gél pórusain keresztül a töltésükkel ellenkező pólus felé vándorolnak (SUTKA, 2004). A vándorlás sebessége a molekulák méretétől és alakjától függ. A DNS molekulák szerkezete egységesen a jellegzetes Watson és Crick típusú B-hélix, tehát alakjuk azonos, ezért a vándorlás sebességet csak a molekula mérete határozza meg (BENYÓNÉ, 2013). Az elválasztás közege általában agaróz gél, ami tengeri moszatból kivont poliszacharid, D-galaktóz és 3,6-L-galaktóz lineáris polimere. A DNS mintát a gélben kialakított zsebekbe juttatják, majd egyenáram segítségével futtatják a gélen. A DNS mintához olyan festéket kell keverni, ami egyrészt biztosítja a minta zsebbe jutását, másrészt mutatja, hogy adott méretű DNS molekula milyen távolságra jutott a gélben (KISS, 1999). A kisebb fragmentumok gyorsabban mozognak, így egységnyi idő alatt a zsebtől távolabbra jutnak, mint a nagyobbak. Úgy lehet megállapítani a molekula pontos méretét, hogy a minta mellett ismert hosszúságú fragmentumot tartalmazó kontrollt (marker, vagy DNS-létra) kell futtatni (BŐSZE, 1999). A vizsgált molekulák láthatóvá tételéhez általában egy alacsony koncentrációban használatos fluorescens festéket, az ethidium-bromidot használják. Alkalmazásának hátránya, hogy már kis koncentrációban is karcinogén, ezért használata megfelelő előkészületet és figyelmességet igényel. Az így megfestett fragmentumok UV fény hatására láthatóak lesznek (KISS, 1999). Az agaróz gél mellett poliakril-amidot is használnak közegnek. Míg az agaróz géleket a magasabb mérettartományban alkalmazzák (200bp-50Kbp), addig a poliakril-amid gélek kisebb méretű (5-500bp) molekulák elválasztására is alkalmasak. Nagy felbontásuknak köszönhetően a fragmentumok összehasonlításakor akár már 1bp-nyi különbségek is észlelhetőek (SAMBROOK et al., 1989).

2.5.3. PCR elve és lépései



Mivel a vizsgálatok során általában nem áll rendelkezésre annyi kiindulási anyag (jelen esetben DNS), amennyi detektálható lenne, ezért szükséges a nukleinsavakat felszaporítani. A PCR (Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció) segítségével a vizsgálandó nukleinsav minták *in vitro* körülmények között felszaporíthatók (BŐSZE, 1999). A módszert Mullis dolgozta ki 1985-ben (MULLIS, FALOONA 1987). A PCR alkalmazása során a DNS csak egy bizonyos régióját szaporítjuk fel, ezért két olyan primerre van szükség, amely a szakasz 5' végét, illetve 3' végét jelöli.

1. ábra: A Polimeráz láncreakció (Forrás: Florida Museum of Natural History)

A primerek tehát komplementerek az amplifikálandó DNS szakasz elejével, illetve végével, így a felszaporítandó DNS szakasz végénél hibridizálnak a DNS-templáthoz. Ezzel lehetővé teszik a DNS-polimeráz megfelelő helyen történő kapcsolódását. A PCR kivitelezésénél előzetes információ szükséges a célszekvenciáról, mivel a primereket mesterségesen állítják elő, ezeket előzetesen meg kell tervezni (BENYÓNÉ, 2013). A PCR komponensei a következők:

1. DNS minta
2. Primerek
3. DNS-polimeráz (Taq-polimeráz, 95°C -on is stabil marad)
4. Nukleozid-trifoszfátok (dNTP), amit a polimeráz beépíthet
5. Puffer: biztosítja az enzim működéséhez szükséges kémiai hátteret
6. MgCl_2 : biztosítja az enzim aktivitását.

A reakció lényege, hogy a denaturált DNS két láncához az ismert szekvenciájú primert hibridizálunk, amelyek a felszaporítandó szakaszok végeit jelölik ki, majd DNS-polimeráz segítségével a primereket meghosszabbítjuk. A reakció ciklikusan ismétlődik (25-40-szer), tehát a képződött DNS-szekvenciák száma exponenciálisan növekszik (KISS, 1999). A PCR fő lépései:

1. Denaturáció (95°C-on, a DNS szálak szétválnak)
2. Hibridizáció, a primerek olvadási hőmérsékletétől 5°C-kal alacsonyabb hőm.-en (45-65°C)
3. Polimerizáció, 68, vagy 72°C-on (SAMBROOK et al., 1989).

A reakcióra speciálisan erre a célra gyártott készülékeket használnak, ahol a ciklus egyes paramétereinek lépései (idő, hőmérséklet) előre programozhatók. A felszaporított DNS-t gélelektroforézis és ethidium-bromidos festés után teszik láthatóvá, és hasonlítják össze a megfelelő markerrel (BŐSZE, 1999).

2.5.4. Markerezési módszerek

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A restrikciós fragmentum-hossz polimorfizmus az első DNS-marker, a módszer a restrikciós endonukleázok alkalmazásán alapul (KISS, 2005). Ezek az enzimek baktériumokból származnak, megakadályozzák a víusból származó DNS fennmaradását annak feldarabolásával. Különlegessége, hogy a DNS-t nem a végénél kezdi bontani, hanem a molekula belsejében (endonukleáz). Több száz restrikciós enzim van, ezek mind különböző, specifikus hasítási hellyel rendelkeznek (BENYÓNÉ, 2013). A módszer lényege ezen alapszik, az enzimek ugyanis mindig a specifikus helyen vágják a DNS-t. Ha a DNS-ek legalább egy hasítási helyben különböznek, lehetővé válik a különbség kimutatása (SUTKA, 2004).

A DNS-t restrikciós enzimekkel emésztik, majd a kapott fragmentumokat gélelektroforézissel szétválasztják. Mivel az adott enzim nagyon sok helyen hasíthatja a genomot, az értékes információt hordozó fragmentumokat ki kell válogatni. Ez a Southern hibridizációval lehetséges. Ennek során a gélen elválasztott fragmentumokat egy membránon átviszik, majd denaturálják a DNS-t. Ezután jelölt DNS próbával hibridizálják a szétválasztott fragmentumokat (KALÓ, 1999). A próba lehet ismert gén, génszakasz, szintetikus

szekvenciák. Amennyiben a próba komplementer a fragmentummal, hibridizál vele, így a keresett fragmentum detektálható a jelölésnek köszönhetően (KISS, 1999).

A módszer előnye, hogy megbízható, nem igényel előzetes ismeretet a szekvenciáról, kodomináns, tehát lehetővé teszi homo- és heterozigóta egyedek megkülönböztetését. Hátránya azonban, hogy nagy mennyiségű DNS-t igényel, bonyolult, időigényes és drága (SUTKA, 2004).

Burgonya esetében az első RFLP markert Barone et al. azonosította 1990-ben, amely kapcsoltságot mutatott a *Globodera rostochiensis* ellen rezisztenciát biztosító *Gro1* génnel (CERNÁK, 2008). A módszer alkalmas allélpolimorfizmus kimutatására, fajtaazonosításra és térképezésre is (BENYÓNÉ, 2013).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A random amplifikált polimorf DNS módszer a PCR alapú markerezési eljárások egyike, a különböző eredetű DNS-ek nukleotidszekvenciáinak sokféleségét mutatja ki egyetlen primer alkalmazásával (BENYÓNÉ, 2013). A módszer véletlenszerűen (random) kiválasztott primerek hibridizációján alapszik. A primer 9-12 bázisból álló oligonukleotid, a reakció során a DNS két szálához véletlenszerűen hibridizál, ezáltal a genom ismeretlen szekvenciáit lehet felszaporítani (KISS, 2005). Amennyiben a primerek a DNS két szálán 200-2000 bp-on belül megtalálják a komplementerüket, akkor a primerek közti távolságnak megfelelő DNS szakasz fog felszaporodni a reakció során (CERNÁK, 2008). Az így kapott fragmentumok száma attól függ, hogy a primer hányszor talál komplementer szakaszokat a DNS-en egymással szemben levő pozícióban (KISS, 2005). A termékeket gélelektroforézissel lehet elválasztani egymástól, a polimorfizmus az így elválasztott fragmentumok eltérő számában és méretében nyilvánul meg (SUTKA, 2004).

A módszer előnye, hogy egyszerűen, gyorsan kivitelezhető. Hátránya azonban, hogy az eredmények nem minden esetben reprodukálhatók, valamint a markerek domináns öröklődést mutatnak, ezért ez a módszer heterozigóta egyedek megkülönböztetésére nem alkalmasa (KALÓ, 1999).

A burgonya esetében Ballvora et al. (1995) használta a *Globodera rostochiensis* ellen rezisztenciát biztosító *Gro1* génnel kapcsolt markerek azonosításához (CERNÁK, 2008). Alkalmas genetikai rokonság megállapítására, tulajdonságok térképezésére, fajták homogenitásának vizsgálatára, DNS-ujlenyomat készítésére (BENYÓNÉ, 2013).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Az amplifikált fragmentumhossz polimorfizmus a genomi DNS restrikciós enzimmel való emésztésén, illetve az így kapott fragmentumok szelektív PCR amplifikációján alapuló módszer (KISS, 2005). A DNS-t restrikciós endonukleázokkal hasítják, egy gyakran, illetve egy ritkán hasító enzimmel. A ritkán vágó enzimek csökkentik az amplifikálódó fragmentumok számát, és szabályozzák a szükséges szelektív nukleotidok mennyiségét. A gyakran hasító nukleázok több, kisebb fragmentumot hoznak létre és biztosítják azok diverzitását (BENYÓNÉ, 2013). A fragmentumok végein elhelyezkedő bázisok ismertek, mivel ismerjük a restrikciós endonukleázok hasítási helyét, így a fragmentumok végeihez helyspecifikus, ds (kettős fonalú) adaptereket ligálnak. Mivel az adapterek teljes bázissorrendje ismert, a PCR során olyan primereket lehet alkalmazni, amelyek ezekhez kötődnek (NAGY, 1999). A szelektív amplifikációt radioaktívan, vagy fluoreszcensen jelölt primerek biztosítják (SUTKA, 2004). A fragmentumok elválasztása nagyfelbontású poliakrilamid gélen történik. A detektálás a jelölés típusától függően történhet autoradiográfiával, illetve fluorescens jelölés, vagy ezüst-festés segítségével (BENYÓNÉ, 2013). Az így kapott mintázatot a restrikciós fragmentumok hosszának különbsége eredményezi.

Előnye, hogy bármely fajra alkalmazható, a szekvencia előzetes ismerete nélkül. Jól reprodukálható, mivel a folyamat szigorú reakciókörülmények között folyik (SUTKA, 2004). Hátránya, hogy nagyon jó minőségű DNS-t igényel, mivel a restrikciós endonukleázok nagyon érzékenyek a DNS tisztaságára. Emellett nagy felszereltséget igényel, bonyolult módszer, a primerek jelölése pedig meglehetősen költséges. Domináns öröklődést mutat (KISS, 2005).

Burgonya esetében az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer az AFLP, kapcsoltsági térképek szerkesztésére is gyakran alkalmazzák (CERNÁK, 2008).

SSR (Simple Sequence Repeat)

Az egyszerű szekvenciaismétlődések, vagy mikroszatellitek nem kódoló, a genomban gyakran ismétlődő nukleotidsorozatok. Általában 2-5 bázispár hosszúak, a genomban több másolatban is jelen vannak, eloszlásuk egyenletes, nagy polimorfizmust mutatnak (SUTKA, 2004). A mikroszatelliteket határoló DNS szakaszok szekvenciái fajon belül általában azonosak. Ezekre az azonos szekvenciákra tervezett primerek segítségével a közbeeső mikroszatellit régiók felszaporíthatók PCR-rel (BENYÓNÉ, 2013). A kapott fragmentumokat poliakrilamid gélen futtatva az ismétlődő szakaszok ismétlődésszámbeli különbsége kimutathatók, mégpedig a kapott fragmentumok eltérő hossza alapján (CERNÁK, 2008). A

mikroszatellitek kodomináns öröklődésűek, alkalmasak kapcsoltsági térképek készítésére, fajtaazonosításra, populációgenetikai tanulmányokra (KISS, 2005).

Ennek az eljárásnak az előnye, hogy az itt használt markerek többi molekuláris markerhez viszonyítva jóval több allélikus formában fordulnak elő, illetve analízisük jól reprodukálható (SUTKA, 2004). Hátránya, hogy a primerek kifejlesztése költség- és munkaigényes, nagyfelbontású poliakril-amid gélen kell futtatni a fragmentumokat, ezek méretének pontos meghatározása szintén költséges (BENYÓNÉ, 2013). Emellett a primerek tervezése előtt a mikroszatellitek határoló régiót klónozni és szekvenálni kell, ami szintén költségigényes (KISS, 1999).

Az SSR markereket először burgonya fajták azonosítására használták Provan et al. (1996). Ezen markerek felhasználásával később elkészítették a teljes genomot lefedő kapcsoltsági térképet. *Globodera pallida*, illetve *Phytophthora infestans*-sal szemben rezisztenciát nyújtó *QTL*-hez is azonosítottak már kapcsolt SSR markert (CERNÁK, 2008).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

A módszer a mikroszatellit régiókra épül, de jelen esetben a primerek magukhoz a mikroszatellitekhez kötődnek (BENYÓNÉ, 2013). A primerek valamely végükön túlnyúlnak az ismétlődéseket tartalmazó szakaszon, ezáltal a vizsgált mikroszatellit fragmentum elejéhez, vagy végéhez kötődhetnek. Így egy szakasról csak egy fragmentum képződik (KISS, 2005). Egy primert használnak, amely lényegesen hosszabb, magas a primer olvadási hőmérséklete, ezért specifikusabb, megbízhatóbb a reakció. Domináns öröklődésű (BENYÓNÉ, 2013).

Burgonya esetében eleinte fajtaazonosításra használták, később különböző tulajdonságot meghatározó gének markerezésére, például a burgonya S vírussal szemben rezisztenciát biztosító *Ns* gén markerezésére (CERNÁK, 2008).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

Az AFLP, illetve a RAPD vizsgálatokkal kapott DNS fragmentumokat klónozva, majd szekvenálva meghatározott nukleotid sorrend kapható, amely alapján a markerre specifikus primerpárok tervezhetők. Így a marker SCAR markerré alakítható. Ezzel lehetőség nyílik adott DNS fragmentum PCR-rel történő felszaporítására, illetve adott tulajdonság marker alapú szelekciójára.

Burgonya esetében a SCAR markereket KASAI et al. (2000) burgonya Y rezisztenciát biztosító gént (*Ry_{adg}*) hordozó genotípusok szelektálására alkalmazták (CERNÁK, 2008).

2.5.5. Marker alapú szelekció

A klasszikus növénynemesítés célja a gazdasági szempontból hasznos tulajdonság bevitele, vagy felerősítése. A nemesítők általában a hasznos tulajdonságokat hordozó szülők, esetenként vad fajok keresztezéséből indulnak ki, amelyet aztán az utód populáció szelekciója követ (KISS, 2005). A bevinni kívánt tulajdonsághoz azonban nem kívánt tulajdonságok is kapcsolódhatnak, amelyektől több generáción keresztül végzett visszakeresztezéssel szabadulnak meg (CERNÁK, 2008). A visszakeresztezések, öntemékenyítések, illetve tesztelések meglehetősen idő és költségigényes folyamatok (GÁBORJÁNYI et al., 1999, LÖNHÁRD, 1997). A markerek lehetővé teszik a kívánt tulajdonságokra történő direkt szelektálást, ezzel jelentősen meggyorsítva a rezisztencia nemesítés folyamatát. A szelekció előfeltétele, hogy a marker szoros kapcsolatban legyen a kívánt tulajdonságot hordozó génnel (PEPÓ, 2010). Meg kell jegyezni ugyanakkor, hogy a burgonya heterozigótasága limitálja a markerek alkalmazhatóságát a gyakorlati nemesítésben. Erre a következtetésre jutott TAN et al. (2005), KREUZ et al. (2005), valamint CERNÁK (2008).

3. Saját vizsgálatok

3.1. Anyag és módszer

A vizsgálatokat a keszthelyi Burgonyakutatói Központban, illetve a Növénytudományi és Biotechnológiai Tanszék Biotechnológia csoport laboratóriumában végeztük. Vizsgálatunk célja egyes génbanki tételek burgonya Y, X vírussal, illetve fonálféreggel szembeni rezisztencia tesztje molekuláris markerek segítségével. A rezisztenciákért felelős géneket SCAR markerek segítségével kerestük. A keresett gének: Ry_{sto} (PVY), Rx_{acl}, Rx_{adg} (PVX), illetve H1 (fonálféreg).

A rezisztenciákért felelős gének térképezése, illetve a kapcsoltan elhelyezkedő markerek azonosítása megtörtént, a marker alapú szelekció gyakorlati alkalmazhatósága és megbízhatósága burgonya esetén már bizonyított (CERNÁK, 2008, AHMADVAND, 2013). A molekuláris markerek segítségével nagy valószínűséggel meghatározható az adott tulajdonság jelenléte, vagy hiánya.

3.1.1. A vizsgálatok növényanyaga

Jelen vizsgálatban a Burgonyakutatói Központ génbankjából származó 14 genotípust teszteltünk: Snowden, Kastia, Laura, Lavina, Marabel, Murato, Sante, Aladin, Mindenes, Sárvári Piroska, Sárvári Rubinka, Sárvári Rózsa, Sárvári Borostyán, Albatros. Pozitív kontrollként Y vírus esetében a White Lady és a 76.9104, X vírus esetén a White Lady és Lady Rosetta, fonálféreg esetében pedig a White Lady genotípust használtuk. Negatív kontrollként az S440 genotípust használtuk PVY és fonálféreg esetén, PVX esetében pedig a W1100 genotípust. A vizsgálatokban szereplő növényi anyag szabadföldi minta, a Burgonyakutatói Központ tenyészertéből származik. A levelek begyűjtése nyár elején történt, a fiatal hajtások végéről. A begyűjtést követően a növényi anyagot folyékony nitrogénbe helyeztük, majd hűtőtárolóban, -70°C -on tároltuk a vizsgálatok megkezdéséig.

A vizsgálatban szereplő 14 genotípus rezisztencia tulajdonságairól fajtaleírásokból, illetve katalógusokból tájékozódunk. Sajnos a rendelkezésre álló információ, főleg vírusrezisztencia tekintetében meglehetősen hiányos, ami szintén indokolja a rezisztencia teszt szükségességét.

Snowden

A közönséges varasodásnak (*Streptomyces scabies*) közepesen ellenáll (EUROPOTATO, 2014).

Kastia

Fitoftórával (*Phytophthora infestans*) szemben kiemelkedően nagyfokú horizontális rezisztenciát tapasztaltak (GERGELY, 2004).

Laura

PLRV-re közepesen fogékony, PVY-vel szemben mérsékelten rezisztens. Lombja burgonyavészre nagyon fogékony. Gumója a közönséges varasodással és a gumórothadásokkal szemben mérsékelten rezisztens, élettani elváltozásokra csak kismértékben hajlamos (pl. vasfoltosság, edénnyaláb-fásodás), a vírusos gyűrűsfoltosság kismértékben károsíthatja. Burgonya-fonálféreggel szemben rezisztens (Ro₁, Ro₂, Ro₃, Ro₄, Ro₅) (PANNON-INFO, 2014).

Marabel

PLRV-re, valamint PVY-ra közepesen fogékony. Lombfitoftóra és sugárgombás varasodás iránti fogékonysága közepes. Gumórothadásokkal szemben mérsékelten rezisztens, élettani betegségekre, elváltozásokra nem hajlamos. A burgonya-fonálféreg Ro₁, Ro₄ patotípusaival szemben rezisztens (PANNON-INFO, 2014).

Sante

Fuzáriumos rothadással (*Fusarium* spp.) szemben közepesen ellenálló, főmásgumókorhadásra (*Phoma foveata*) fogékony, burgonyavésszel szemben közepesen ellenálló. Laboratóriumi vizsgálatok alapján a burgonyavésszel szemben mind a lombozat, mind a gumó magas fokú ellenállóságot mutatott. Poros varasodással szemben (*Spongospora subterranea*) rezisztens. Erwiniás rothadással (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) szembeni ellenállósága alacsony, míg közönséges varasodással (*Streptomyces scabies*) szemben közepesen ellenálló. PLRV, PVA, PVB, PVC, PVX, PVY vírusokkal szemben magas fokon rezisztens, dohány rattle vírussal szemben közepesen ellenálló. Fonálféreg Ro₁, Ro₂, Ro₃, Ro₄ patotípusaival szemben rezisztens (EUROPOTATO, 2014).

Aladin

PLRV-vel, valamint PVY-val szemben mérsékelten rezisztens. Lombfitofórára nagyon fogékony. Gumója a közönséges varasodással szemben mérsékelten rezisztens, gumórothadásokra közepesen fogékony, üvegességre és edénnyaláb-fásodásra a közepesnél hajlamosabb. Burgonya-fonálféreg Ro₁, Ro₄ patotípusaival szemben rezisztens (PANNON-INFO, 2014).

Mindenes

Burgonyavészre mind a lombozat, mind a gumó fogékony, közönséges varasodásra (*Streptomyces scabies*) fogékony. PLRV rezisztenciája közepes, míg PVY rezisztenciája alacsony (EUROPOTATO, 2014).

Sárvári Piroska

A legfontosabb leromlást okozó vírusbetegségekkel (PLRV, PVY, PVA, PVX) szemben rezisztens. A fitofóra gombabetegséggel szemben magas fokú horizontális rezisztenciával rendelkezik (SÁRVÁRI BURGONYA, 2014.).

Sárvári Rubinka

PLRV, PVY, PVA, PVX vírusokkal szemben rezisztens. A nagy kárt okozó fitofórával szemben, magas szintű horizontális rezisztenciával rendelkezik. Ökológiai termesztésre ajánlható (SÁRVÁRI BURGONYA, 2014.).

Sárvári Rózsa

PLRV, PVX, PVA, PVY vírusokkal szemben kiváló rezisztenciával rendelkezik. Fitofóra gombabetegséggel szemben magas szintű horizontális rezisztenciával rendelkezik (SÁRVÁRI BURGONYA, 2014.).

Sajnos a **Lavina**, **Murato**, **Sárvári Borostyán**, és **Albatros** fajtákról nem találtunk információt a rezisztencia tulajdonságokra vonatkozóan.

3.1.2. DNS tisztítás

A begyűjtött levélmintákból a WALBOT és WARREN (1988) által használt, módosított eljárással tisztítottunk DNS-t. Fajtánként és vizsgálatonként 100 mg növényi mintát folyékony nitrogén jelenlétében homogenizáltuk, majd 1,5 ml lízis puffert adtunk hozzá (15% szacharóz, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 500 mM NaCl). Ezt követően a folyadékot 1300 1/min fordulaton, kilengő rotoros centrifugával centrifugáltuk, majd a folyadékot eltávolítottuk.

Ezt a mintában lévő fehérjék kicsapása követte. A csapadékhoz 300 µl 20T-10E puffert (20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)), valamint 20 µl 20%-os SDS-t adtunk, majd 15 percig inkubáltuk 70 °C-on (hősokk). 150 µl 7,5M ammónium-acetátos denaturáció után a mintákat 30 percig jégre tettük. Újabb centrifugálást követően a felső, tiszta réteget mikrocentrifuga (Eppendorf) csövekbe pipettáztuk, és vele azonos mennyiségű izo-propanol hozzáadásával 15 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezután a mintákat centrifugáltuk, majd a DNS-t 500 µl TE pufferben visszaoldottuk.

Ezt a poláros és apoláros fázis szétválasztása követte, amelyet kloroform: izoamil-alkohol 25:1 arányú keverékes kezeléssel végeztünk el. Ezután 40 µl 5M-os nátrium-acetátot és 1ml etanolt adtunk a mintákhoz, majd újból centrifugáltuk. Végül 70%-os etanolos tisztítás után a DNS csapadékot TE pufferben visszaoldottuk. A tisztított DNS mintákat a vizsgálatok megkezdéséig hűtőtárolóban tároltuk 4 °C-on.

3.1.3. PCR

A SCAR analízis során a PCR reakciót 20 µl reakció eleggyel végeztük el mintánként. Az elegy a következő komponenseket tartalmazta:

- 2 µl (20 ng) templát DNS,
- 2 µl (2 mM) dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),
- 2 µl (2 mM) 10x PCR puffer (10 mM Tris-HCl, (pH 8,8), 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100),
- 0,2-0,2 µl (100pM/ µl) primer, a primer pár mindkét tagjából,
- 0,4 µl Dream Taq DNS polymeráz enzim,
- 13,2 µl nukleázmentes víz (NFV).

A PCR reakció során primer párokat alkalmaztunk. A 14 genotípust a következő géekre teszteltük: Ry_{sto}, Rx_{acl}, Rx_{adg}, illetve H1. A PCR reakciót a következő profil szerint végeztük:

Ry esetén:

1 ciklus 94°C, 1 perc, majd ezt követte 35 cikluson át 94°C 30 másodperc, 57°C 1 perc, 72°C 2 perc, a végső extenzió 72°C 10 perc volt.

Rx esetén:

1 ciklus 94°C, 3 perc, majd ezt követte 30 cikluson át 94°C 20 másodperc, hibridizáció a primerek olvadási hőmérsékletétől függően 62°C, 66°C 15 másodperc, 72°C 1 perc, a végső extenzió 72°C 3 perc volt.

H1 esetén:

1 ciklus 94°C, 2 perc, majd ezt követte 35 cikluson át 94°C -on 20 másodperc, 55°C -on 20 másodperc, 72°C -on 30 másodperc, a végső extenzió 72°C -on 5 perc volt.

A SCAR analízishez felhasznált primerek szekvenciái:

Ry_{sto}: ST1 marker (még nem publikált)

Rx_{adg}: 5Rx1 marker

Forward: 5'-TCAGGGCAAACCCCTAACAC-3' (62°C)

Reverse: 5'-ATCGGCCTAGAGTGACATCG-3'

Rx_{acl}: 106Rx2 marker

Forward: 5'-GGAGAAATCCTGCAATGTAAC-3' (66°C)

Reverse: 5'-CTTGTCAAAGAAAGAAGGCCT-3'

H1: TG689 marker

Forward: 5'-TAAACTCTTGGTTATAGCCTAT-3'

Reverse: 5'-CAATAGAATGTGTTGTTTCACCAA-3'

3.1.4. Gélelektroforézis, géldokumentáció

A PCR reakció során felszaporított 20 µl termékekhez 5 µl Brome-Phenol Blue Xylene Cyanol festéket (BPB) adtunk, majd az így megfestett terméket az agaróz gélen kialakított zsebekbe pipettáztuk.

A 1,5%-os agaróz gél a következőképp készítettük: 7,5 g agarhoz hozzáadtunk 500 ml 0,5%-os TBE puffert (Tris-HCl-Boric acid-EDTA), valamint 2l ioncserélt vizet, ezután felfőztük, majd az előre kialakított 20 cm x 16,5 cm-es formába öntöttük.

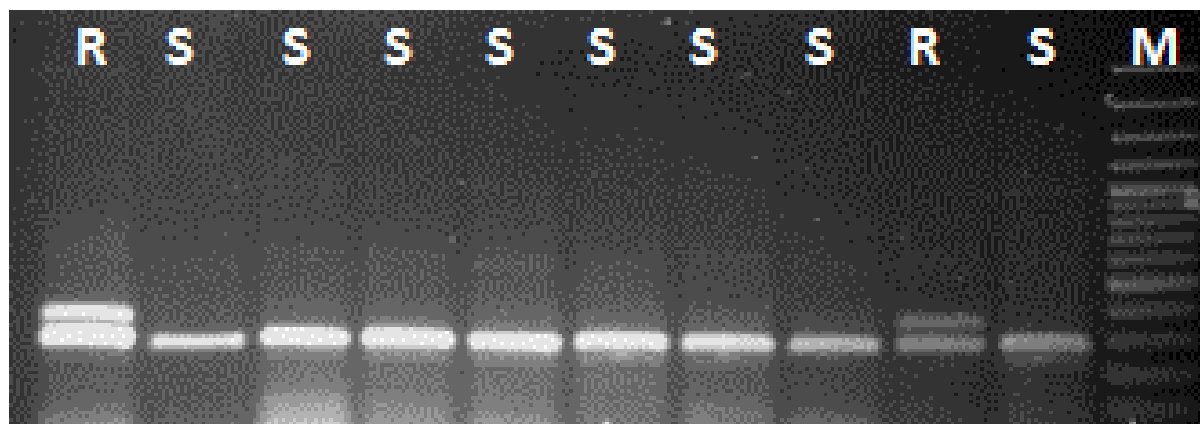
A termékeket az agaróz gélen, 0,5%-os TBE pufferben választottuk szét, 220V AC, 1,5 óra alatt. Ezután a megfuttatott termékeket tartalmazó géleket 20 percig ethidium-bromidot tartalmazó TE pufferben (85 µl/1000ml) festettük. A mintázat folyó csapvizet öblítését

követően az adatokat a Syngene GeneGenius géldokumentációs rendszerrel értékeltük. A módszer lényege, hogy az ethidium-bromid hozzákapcsolódik a DNS-hez, amely UV-fény alatt láthatóvá tehető. Az adatok elemzése a fragmentumok megléte, vagy hiánya alapján történt.

3.2. Eredmények és értékelésük

3.2.1. PVY

A vizsgált genotípusok rezisztencia tesztre adott reakcióját a gélképeket elemezve értékeltük. Az Ry_{sto} gént az ST1 markert használva mutattuk ki. Kontrollként a rezisztens White Lady, és a fogékony S440 genotípust használtuk. A marker segítségével meghatározható a keresett gén jelenléte, vagy hiánya (**2. ábra**).



Az ST1 marker amplifikációs mintázata a két kontrollon, illetve nyolc genotípuson: White Lady, S440, Kastia, Murato, Aladin, Sante, Laura, Albatros, Lavina, Snowden. S: fogékony, R: rezisztens, M: GeneRuler marker

2. ábra: A burgonya Y vírus rezisztencia teszt gélképe

A vizsgálat eredményeit a **2. táblázat** szemlélteti. A vizsgált növényanyagban három Ry_{sto} gént hordozó genotípust találtunk: Lavina, Mindenés, illetve a S. Borostyán.

2. táblázat: A burgonya Y vírus rezisztencia teszt eredménye

Sorszám	Genotípus	Ry-sto
1	Snowden	S
2	Kastia	S
3	Laura	S
4	Lavina	R
5	Marabel	S
6	Murato	S
7	Sante	S
8	Aladin	S
9	Mindenes	R
10	S. Piroska	S
11	S. Rubinka	S
12	S. Rózsa	S
13	S. Borostyán	R
14	Albatros	S

S: fogékony, R: rezisztens

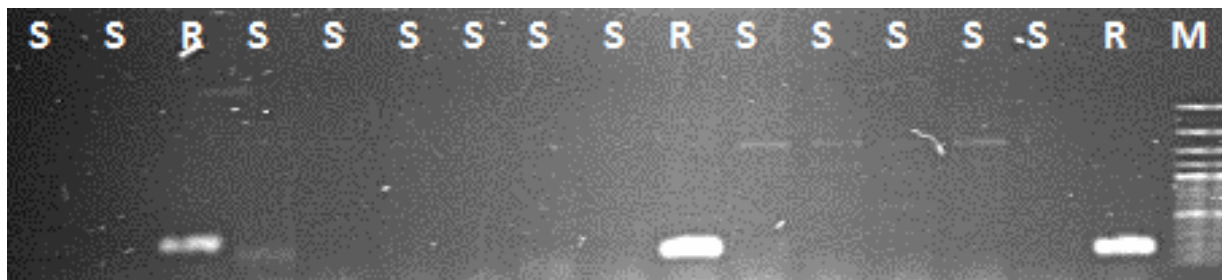
3.2.2. PVX

Az Rx_{adg} gént az 5Rx1 marker, az Rx_{acl} gént pedig a 106Rx2 marker használatával azonosítottuk. Mindkét esetben kontrollként a fogékony W1100 genotípust alkalmaztuk, pozitív referencia Rx_1 esetén a Lady Rosetta, Rx_2 esetében a White lady volt. A PVX rezisztencia tesztre adott vizsgálat eredményeit a **3. táblázat** szemlélteti. Három genotípust találtunk, amely az Rx_{acl} gént hordozza: Kastia, Lavina, illetve a S. Rózsa. Az Rx_{adg} gént hordozó genotípusok a következők: Sante, Albatros. A vizsgált növényanyagban összesen öt genotípust találtunk, amely valamely Rx gént hordozza. A gélelektroforézissel kapott mintázatot a **3. ábra** mutatja.

3. táblázat: A burgonya X vírus rezisztencia teszt eredménye

Sorszám	Genotípus	Rx-acl	Rx-adg
1	Snowden	S	S
2	Kastia	R	S
3	Laura	S	S
4	Lavina	R	S
5	Marabel	S	S
6	Murato	S	S
7	Sante	S	R
8	Aladin	S	S
9	Mindenes	S	S
10	S. Piroska	S	S
11	S. Rubinka	S	S
12	S. Rózsa	R	S
13	S. Borostyán	S	S
14	Albatros	S	R

S: fogékony, R: rezisztens



Az 5Rx1 marker amplifikációs mintázata a kontroll, illetve a vizsgált genotípusokon: S. Borostyán, Laura, Sante, Murato, Marabel, Snowden, S. Rubinka, S. Piroska, Kastia, Albatros, S. Rózsa, Mindenés, Lavina, Aladin, W1100, Lady Rosetta. S: fogékony, R: rezisztens, M: GeneRuler marker



A 106Rx2 marker amplifikációs mintázata a kontrollon, illetve a vizsgált genotípusok felén: W1100, White Lady, Sante, Aladin, Mindenés, Laura, Kastia, Lavina, S. Rózsa.
S: fogékony, R: rezisztens, M: GeneRuler marker

3. ábra: A burgonya X vírus rezisztencia teszt gélképei

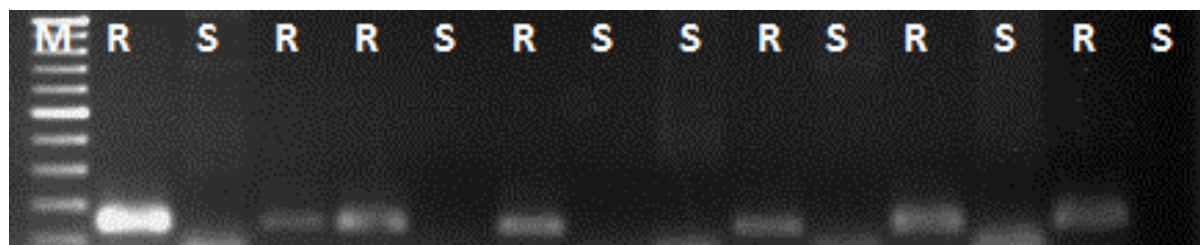
3.2.3. Fonálféreg

Hasonlóan az előző két vizsgálathoz, az eredményeket táblázatban tüntettük fel, a fonálféreg rezisztencia eredményeit a **4. táblázat** tartalmazza. Kontrollként a rezisztens White Lady, illetve a fogékony S440 genotípust alkalmaztuk. A vizsgált genotípusok több mint fele, összesen nyolc genotípus hordozza a H1 rezisztencia gént: Kastia, Laura, Lavina, Murato, Sante, Mindenés, S. Borostyán, illetve az Albatros. A vizsgálatok eredményeit gélképen a **4. ábra** szemlélteti.

4. táblázat: A fonálféreg rezisztencia teszt eredménye

Sorszám	Genotípus	H1
1	Snowden	S
2	Kastia	R
3	Laura	R
4	Lavina	R
5	Marabel	S
6	Murato	R
7	Sante	R
8	Aladin	S
9	Mindenes	R
10	S. Piroska	S
11	S. Rubinka	S
12	S. Rózsa	S
13	S. Borostyán	R
14	Albatros	R

S: fogékony, R: rezisztens



A TG689 marker amplifikációs mintázata: Mindenes, Aladin, Sante, Murato, Marabel, Lavina, S. Piroska, S. Rubinka, S. Borostyán, S. Rózsa, Albatros, Snowden, Laura, S440. S: fogékony, R: rezisztens, M: marker

4. ábra: A fonálféreg rezisztencia teszt gélképe

4. Összefoglalás

A burgonya jelentőségét tükrözi a népelelmezésben, állati takarmányozásban betöltött szerepe. Hazánkban a termésátlagok alacsonyabbak, mint amit az ökológiai adottságaink lehetővé tennének, melynek fő oka a növények nem megfelelő egészségi állapota. A legnagyobb kockázatot a vírusok jelentik, hiszen a vírusbetegségek terjedésének következtében a termés kiesés gyakran a 30%-ot is eléri.

Magyarországon az étkezési burgonya vetésterülete csökkenő tendenciát mutat, így a hazai fogyasztás kielégítése csak növekvő termésátlaggal érhető el. Ehhez a megfelelő agrotechnika alkalmazásán felül olyan fajták nemesítése válik szükségessé, amelyek biotikus és abiotikus stresszekkel szemben ellenállóak, ugyanakkor beltartalmi értékük megfelelő.

A termesztett fajták rezisztencia tulajdonságai nagymértékben befolyásolják a termelés gazdaságosságát is, ugyanakkor környezetkímélő termesztést tesznek lehetővé. A hazánkban termesztett fajták rezisztencia tulajdonságai tehát nagyon fontos szempont.

A keszthelyi Burgonyakutatói Központban rendelkezésre álló kiváló minőségű fajták rezisztensek a legnagyobb gazdasági kárt okozó vírusokkal szemben, amelyek a burgonya Y, X, A és levélsodródás (PLRV) vírus. Az újabb fajták nemesítése napjainkban is folyamatosan zajlik, ezért a génbankban rendelkezésre álló tételek illetve nemesítési vonalak rezisztencia tulajdonságainak ismerete alapvető fontosságú. Mivel a növények felnevelése, hagyományos rezisztencia tesztje pénz és időigényes, karantén kórokozók esetén pedig nem kivitelezhető, ezért olyan gyors és megbízható módszert kellett találni, amellyel a kívánt tulajdonság nyomon követhető. Erre a célra a tulajdonsághoz kapcsolt molekuláris markerek alkalmasak, használatukkal jelentősen lerövidíthető a kívánt tulajdonságokra történő szelektálás ideje és költsége.

Vizsgálatunk célja a PE AC Burgonyakutatói Központ génbanki anyagainak rezisztencia tesztje molekuláris markerek segítségével. A burgonya Y, X vírussal, illetve fonálféreggel szembeni rezisztenciákért felelős géneket SCAR markerek segítségével kerestük. A keresett gének: $R_{y_{sto}}$ (PVY), $R_{x_{acl}}$, $R_{x_{adg}}$ (PVX), illetve H1 (fonálféreg). Jelen vizsgálatban 14 fajtát vizsgáltunk: Snowden, Kastia, Laura, Lavina, Marabel, Murato, Sante, Aladin, Mindenés, Sárvári Piroska, Sárvári Rubinka, Sárvári Rózsa, Sárvári Borostyán, Albatros.

Három $R_{y_{sto}}$ gént hordozó genotípust találtunk a vizsgált növényanyagban: Lavina, Mindenés, illetve a S. Borostyán. Három genotípust találtunk, amely az $R_{x_{acl}}$ gént hordozza: Kastia, Lavina, illetve a S. Rózsa. Az $R_{x_{adg}}$ gént hordozó két genotípus a következő: Sante, Albatros. A vizsgált genotípusok több mint fele, összesen nyolc genotípus hordozza a H1 rezisztencia gént: Kastia, Laura, Lavina, Murato, Sante, Mindenés, S. Borostyán, illetve az Albatros.

A jelen kutatás eredményeivel hozzájárulhatunk a nemesítők munkájához, lecsökkentve a rezisztencia tulajdonságokkal bíró, új fajták előállításának idejét és költségét.

5. Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hoffmann Borbála tanszékvezető egyetemi docensnek, aki mindig szakított időt rám, rengeteg tudásanyagot bocsátott a rendelkezésemre, és mindig segítőkész volt, ha megakadtam a dolgozatírás közben.

Köszönettel tartozom Dr. Polgár Zsoltnak, a Burgonyakutatói Központ igazgatójának, aki biztosította számomra a lehetőséget és a feltételeket a kísérletek elvégzésére.

Hálás vagyok Dr. Cernák Istvánnak, a Burgonyakutatói Központ tudományos munkatársának, aki nagy türelemmel vezetett be a marker alapú szelekció rejtelseibe, illetve rengeteg információt bocsátott rendelkezésemre a molekuláris markerekről, valamint a kísérletben szereplő növényanyagról. Nélkülözhetetlen szakmai tanácsaival, önzetlen támogatásával alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez és sikeres munkámhoz.

Felhasznált irodalom

ADAMS, M.J., ANTONIW, J.F., BAR-JOSEPH, M., BRUNT, A.A., CANDRESSE, T., FOSTER, G.D., MARTELLI, G.P., MILNE, R.G., FAUQUET, C.M. (2004): The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. Archives of Virology 149. p.1045-1060.

AHMADVAND, R., TALLER J., WOLF I., POLGÁR ZS. (2012): Identification of the resistance gene to PVX in Hungarian potato cultivars. 54. Georgikon Napok. Keszthely. p.1-3.

AHMADVAND, R. (2013): Burgonya rezisztenciagének vizsgálata, különös tekintettel génexpressziós megközelítésekre. Doktori értekezés, Keszthely. p.9-12.

AHMADVAND, R., WOLF I., AHMAD MOUSAPOUR GORJI A. M., POLGÁR ZS., TALLER J. (2013): Development of Molecular Tools for Distinguishing Between the Highly Similar Rx1 and Rx2 PVX Extreme Resistance Genes in Tetraploid Potato. Potato Research 56. p.277–291.

BEKE L. (1930): A burgonya. Pátria, Budapest. In: Lőrincz J. (szerk.): A burgonya termesztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. p.13.

BENDAHDANE, A., BAULCOMBE, D.C., KANYUKA, K. (1999): The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11., p.781-791.

BENYÓNÉ GY. ZS. (2013): Molekuláris markerezés. In: Lukács N. (szerk.): Növényi biotechnológia. Budapesti Corvinus Egyetem egyetemi jegyzet, Budapest. p.50-60.

BERTSCH K.-BERTSCH F. (1949): Geschichte unserer Kulturpflanze. Wiss. Verlagsges, Stuttgart. 213-219. p. In: Lőrincz J. (szerk.): A burgonya termesztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. p.12.

BIRYUKOVA, V.A., ZHURAVLEV, A.A., ABROSIMOVA, S.B., KOSTINA, L.I., KHROMOVA, L.M., SHMYGLYA, I.V., MOROZOVA, N.N, KIRSANOVA, S.N. (2008): Use of Molecular Markers of Potato Golden Nematode Resistance Genes *H1* and *GRO1*. *Russian Agricultural Sciences*, Vol. 34, No. 6. p.365–368.

BISZTRAY GY. (2001): Molekuláris genetikai markerek. In: Velich István (szerk.): Növénygenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.264-279.

BOCZ E. (1992): Burgonya. In: Szántóföldi növénytermesztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.575-577., p.579., p.588-591.

BŐSZE Z. (1999): A nukleinsavak jellemzésének módszerei. In: Horváth J.- Gáborjányi R. (szerk.): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.270-282.

CERNÁK I. (2008): A *Solanum stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus (PVY) extrém rezisztencia gén (*Ry_{sto}*) markerezése. Doktori értekezés, Keszthely. p.12-19., 26-32.

DOBRÁNSZKY J., MAGYARNÉ TÁBORI K. (2005): A burgonya mikroszaporítása. In: Jámborné Benczúr E.-Dobránszki J. (szerk.): Kertészeti növények mikroszaporítása. *In vitro* növényklónozás. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.156-163.

EUROPOTATO: <http://www.europotato.org/> (utolsó letöltés: 2014.12.17.)

EUROSTAT: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/> (utolsó letöltés: 2014.09.26.)

FAO: <http://faostat3.fao.org/> (utolsó letöltés: 2014.09.26.)

FERRIS, H. (2008): Globodera rostochiensis. University of California.

<http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/G053S2.HTM>

(utolsó letöltés: 2014.10.03.)

FLORIDA MUSEUM OF NATURAL HISTORY:

<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.gif> (utolsó letöltés: 2014.10.03.)

FOXÉ, M.J. (1992): Breeding for resistance: conventional methods. Neth. J. Pl. Path. 98 (Suppl. 2.), p.13-20.

GÁBORJÁNYI R., HORVÁTH J., WOLF I. (1999): A vírus-ellenállóságra nemesítés hagyományos ,módszerei. In: Horváth J.- Gáborjányi R. (szerk.): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.348-356.

GEBHARDT, C., VALKONEN, J.P.T. (2001): Annu. Rev. Phytopathol. In: Biryukova, V.A., Zhuravlev, A.A., Abrosimova, S.B., Kostina, L.I., Khromova, L.M., Shmyglya, I.V., Morozova, N.N, Kirsanova, S.N. (2008): Use of Molecular Markers of Potato Golden Nematode Resistance Genes *HI* and *GRO1*. Russian Agricultural Sciences, Vol. 34, No. 6. p.365–368.

GERGELY L. (2004): Burgonyafajták rezisztenciavizsgálata fitoftóra- (*Phytophthora infestans*[Mont.] de Bary) fertőzéssel szemben és egyes környezeti tényezők hatása a betegség-ellenállóságra. Doktori értekezés, Keszthely. p.8.

HERMANOVA V., BARTA J., CURN V. (2007): Wild Potato Species: Characterization and Biological Potential for Potato Breeding. In: Increasing the efficiency of potato resistance breeding with traditional and molecular genetic methods. In: Ahmad Mousapour Gorji, PhD Thesis. p.13.

HORVÁTH J. (1995): A szántóföldi növények betegségei. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.126-135.

HORVÁTH J. (1999): A vírusok osztályozása és rendszertana. In: Horváth J.- Gáborjányi R. (szerk.): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.35-36., p.51-52.

HORVÁTH S. (2003): Burgonya. In: Koháry Erzsébet (szerk.): Eleven örökség. Kenyér- és kásanövények a Kárpát-medencében. Agroinform Kiadó, Budapest. p.81-82., p.85-86.

HORVÁTH S. (2004): A burgonya és szaporítása. In: Bedő Z. (szerk.): A vetőmag születése. A vetőmagtermesztés elmélete és gyakorlata. Agroinform Kiadó, Budapest. p.455., p.472.

JÁVOR I. (1963): A burgonya-fonálféreg. Mezőgazdasági Kiadó. p.15-20., 85-99.

KALÓ P. (1999): RFLP és RAPD markerek. Növénytermelés 48. p.549-558.

KANG B.C., YEAM I., JAHN M.M. (2005): Genetics of plant virus resistance. Annu Rev Phytopathol 43. p.581-621. In: Cernák István: A *Solanum stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus (PVY) extrém rezisztencia gén (*Rysto*) markerezése. Doktori értekezés, Keszthely.

KASAI K., MORIKAWA Y., SORRI V.A., VALKONEN J.P.T., GEBHARD C., 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. p.1-8. In: Cernák I. (2008): A *Solanum stoloniferum* eredetű burgonya Y vírus (PVY) extrém rezisztencia gén (*Ry_{sto}*) markerezése. Doktori értekezés, Keszthely. p.12-19., 26-32.

KISS E. (1999): Növényi molekuláris genetika I. Gödöllői Agrártudományi Egyetem egyetemi jegyzet, Gödöllő. p.71-74.

KISS E. (2005): Molekuláris növénynemesítés. In: Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (szerk.): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest. p.194-210.

KOHÁRY E. (2003.), *Szerk.*: Eleven örökség. Kenyér- és kásanövények a Kárpát-medencében. Agroinform Kiadó, Budapest. p.81.

KREUZ L., SEDLAK P., KRENEK P., VEJL P., MELOUNOVA M., ZOUFALÁ J., DOMKÁROVÁ J. (2005): Assessment of applicability of elected potato resistance DNA markers against late blight. 16. Triennial Conference of the EAPR, Abstract book. p.867-871.

KRUPPA J. (2004): Burgonya. In: Izsáki Z.- Lázár L. (*szerk.*): Szántóföldi növények vetőmagtermesztése és kereskedelme. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.422-449.

KSH: <http://www.ksh.hu> (utolsó letöltés: 2014.09.26.)

LÁNG G. (1961): Növénytermesztés. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest. p.180-184.

LÖNHÁRD M. (1979): A burgonya agrobotanikai sajátosságai. In: Lőrincz J. (*szerk.*): A burgonya termesztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. p.17-20.

LÖNHÁRD M. (1997): A burgonya betegségei, kártevői, károsodásai és komplex növényvédelme. Zalaegerszeg, jegyzet. p.8-17., p.56-60.

MULLIS K.B., FALOONA F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerasecatalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155. p.335-350.

NAGY I. (1999): Továbbfejlesztett PCR-alapú polimorfizmusvizsgálati technikák. Növénytermelés 48. p.421-434.

NAPPO (2007): Golden nematode—update on the Canadian situation. North American Plant Protection Organization's Phytosanitary Alert System

<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=297&keyword=globodera%20rostochiensis>

(utolsó letöltés: 2014.10.03.)

OTTOMAN, R. J., HANE, D. C., BROWN, C. R., YILMA S., JAMES, S. R., MOSLEY, A. R., CROSSLIN, J. M., VALES, M. I. (2009): Validation and Implementation of Marker-

Assisted Selection (MAS) for PVY Resistance (R_{yadg} gene) in a Tetraploid Potato Breeding Program. Potato Research 86. p.304–314.

PANNON-INFO: <http://pannon-info.hu/index.php/egeszseg/227-burgonyafajtak-magyarorszagon-mivel-suessuenk-fzzuenk> (utolsó letöltés: 2014.12.17.)

PEPÓ P. (2010): Növénynemesítés. Debreceni Egyetem egyetemi jegyzet, Debrecen. p.111.

POLGÁR ZS. (2005): Biotechnológiai módszerek alkalmazása a burgonyanemesítésben. In: Jámborné Benczúr E.-Dobránszki J. (szerk.): Kertészeti növények mikroszaporítása. *In vitro* növényklónozás. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.165.

POLGÁR ZS. (2012, A): A burgonyatermesztés és kutatás szerepe a hazai agrárgazdaságban. LIV. Georgikon Napok, Keszthely, 2012. október 11-12. Kivonat-kötet, ISBN 978-963-9639-47-8. p.99

POLGÁR ZS. (2012, B): A sikeres burgonyatermesztés alapja a helyesen megválasztott fajta. Mezsgyefórum, XXII. évf. November/December. p.13.

POLGÁR ZS., WOLF I. (2013): Overview the resistance breeding programme of Keszthely. The 17th Joint Meeting of EAPR Breeding and Varietal Assessment Section and EUCARPIA Section potatoes. June 30–July 4, 2013, Hévíz, Hungary. Book of Abstracts. p.15.

POLGÁR ZS., WOLF I., RAHIM A., CERNÁK I. (2013): Hagyományos és biotechnológiai eljárások ötvözése a keszthelyi burgonyanemesítési programban. II. ATK Tudományos Nap, Velünk élő tudomány, 2013. november 8. p.76-79.

POLGÁR ZS., WOLF I., HORVÁTH J., KADLICKÓ S., PINTÉR CS. (2014): A burgonya védelme. Növényvédelem, 50. évf. 6. sz. p.270-297.

REINMUTH E. (1955): A burgonyanematódák biológiája és ökológiája, valamint az ellenük való védekezés alapelvei. In: Jávör I. (1963): A burgonya-fonálféreg. Mezőgazdasági Kiadó. p.98.

ROGOZINA, E. V., KIRU, S.D. (2005): Identified Gene Pool of Plant and Breeding. St. Petersburg: VIR. p.443-470.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. In: Horváth J.- Gáborjányi R. (szerk.): Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.270.

SÁRVÁRI BURGONYA: <http://sarvariburgonya.hu/index.php/fajtaink>
(utolsó letöltés: 2014.12.17.)

SUTKA J. (2004): Növényi citogenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. p.188-204.

TAN A., HUTTEN, R. C. B., VISSER, R. G. F., VAN ECK, H. J. (2005): Development of marker assisted selection for potato breeding. 16. Triennial Conference of the EAPR, Abstract book. p.660-662.

TAS L. (1997): Vetőburgonya szaporítás, felújítás. In: Sárközi F. (szerk.): Amit a vetőburgonyáról tudni kell. Második kiadás. Budapest. p.11.

VALKONEN, J.P.T., SLACK, S.A., PLAISTED, R.L. (1994): Use of the virus strain group concept to characterize the resistance to PVX and PVY⁰ in the potato cv. Allegany. Amer. Potato J. 71. p.507-516.

WALBOT, V., WARREN, C. (1988): Regulation of Mu element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. Molecular and General Genetics MGG. 211. p.27-34.

WHITWORTH, J. L., NOVY, R. G., HALL, D. G., CROSSLIN, J. M., BROWN, C. R. (2009): Characterization of Broad Spectrum Potato Virus Y Resistance in a *Solanum tuberosum* ssp. andigena-Derived Population and Select Breeding Clones Using Molecular Markers, Grafting, and Field Inoculations. Potato Research 86. p.286-296.

NYILATKOZAT

Aláírással nyilatkozom arról, hogy a dolgozat saját munkám, a felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, továbbá a munkámra vonatkozó jogszabályokat betartottam.

Készthely, 20.....

aláírás