

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

Őszi búza × *Triticum timopheevii* hibrid  
utódainak jellemzése

Doktori értekezés tézisei

Dr. Horváthné Uhrin Andrea

Martonvásár

2013

**A doktori iskola**

**megnevezése:**

Növénytudományi Doktori Iskola

**Tudományága:**

Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

**Vezetője:**

Dr. Helyes Lajos

egyetemi tanár, az MTA doktora

SZIE Mezőgazdaság-és Környezettudományi

Kar

Kertészeti technológiai tanszék

**Program:**

Növénygenetika, növénynemesítés és növénybiotechnológia

**Témavezetők:**

Dr. Láng László

tudományos tanácsadó, az MTA doktora

MTA Agrártudományi Kutatóközpont Mezőgazdasági

Intézet

Dr. Lángné dr. Molnár Márta,

tudományos tanácsadó, az MTA doktora

MTA Agrártudományi Kutatóközpont

Mezőgazdasági Intézet

.....

Dr. Helyes Lajos

Iskolavezető jóváhagyása

.....

Dr. Láng László

A témavezető jóváhagyása

.....

Dr. Lángné dr. Molnár Márta

A témavezető jóváhagyása

## A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

Hazánkban az őszi búza (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum* L.,  $2n=6x=42$ , AABBDD) élelmezésben betöltött kiemelkedő helye, vetésterületének nagysága valamint az exportra szánt mennyisége jól tükrözi e növényfaj meghatározó szerepét a növénytermesztési ágazaton belül. A termelés mértékét és minőségét nagymértékben befolyásolhatják a kedvezőtlen környezeti hatások is. A búza agronómiai tulajdonságai, elsősorban a különféle betegségekkel szembeni ellenállóképessége javítható a szélesebb genetikai diverzitással rendelkező növényfajok nemesítésben való felhasználásával. A genetikai variabilitás növelésének egyik hatékony eszköze a búzával rokon fajokkal történő keresztezés, mely során fajidegen egyedi kromoszómákat vihetünk a recipiens növénybe. A fajidegen kromoszómák hasznos agronómiai tulajdonságokat, például betegségekkel, biotikus és abiotikus stresszfaktorokkal szembeni ellenállóképességet növelő géneket hordozhatnak. Az előnyös tulajdonságok mellett azonban kedvezőtlen tulajdonságokat is magukkal hozhatnak, ezért a génátvitel végső célja az, hogy a teljes idegen kromoszóma helyett csak a kívánt tulajdonságokat kódoló géneket tartalmazó kromoszóma-fragmentumot tartalmazza a recipiens fajta. Fontos, hogy a beépült kromoszóma vagy kromoszóma-szegmentum képes legyen kompenzálni a kiesett búzakromoszóma vagy kromoszómaszakasz hatásait. A kompenzációt leginkább a homeológ kromoszómák képesek kiváltani. A homeológ kromoszómák párosodását – és így az intergenomikus transzlokációk indukálását – az 5B kromoszómán levő, kromoszómapárosodást kontrolláló *Ph1* lókuszt gátolja. A *Ph1* lókuszt gátlásával vagy deléciójával kiváltható az idegen kromoszóma törése, transzlokációk létrejötte. A kromoszómákra specifikus mikroszatellit markerek alkalmazásával lokalizálható az idegen kromoszómaszakasz helye, valamint kellő markersűrűség mellett a töréspontok helye is meghatározható. Citogenetikai módszerekkel a különböző genomokból származó kromoszóma-fragmentumok kimutathatók, valamint a genomon belüli kromoszóma átrendeződések és a töréspontok helye is egyaránt vizsgálható. A kérdéses genom kromoszómáinak azonosítása szintén citogenetikai módszerekkel végezhető el. A molekuláris markerek mellett a biokémiai markerek, például az adott fajra jellemző tartalékfehérjék is jelezhetik az idegen kromoszóma jelenlétét vagy hiányát. Az idegen kromoszóma törése után a különböző méretű és helyzetű transzlokációt tartalmazó utódnövények vizsgálatával (például kórokozó mesterséges fertőzés inokulálásával) határozható meg a hasznos tulajdonságot kódoló géneket tartalmazó kromoszóma-szegmentum jelenléte a genomban. A nemesítés ezt követő szakaszaiban a kívánt tulajdonságot hordozó transzlokációs törzsek citogenetikai stabilitásának elérése a cél. A biotechnológiai módszerek fejlődésével napjainkban már a búzával távolabbi rokonságban lévő növényfajok is keresztezhetők és felnevelhetők. A búzával legalább egy homeológ genomot tartalmazó fajokból a hasznos gének keresztezéssel, majd amfiploidok előállításával átvihetők a recipiens búzába. A *Triticum timopheevii* (Zhuk.) ismert a betegségekkel szembeni ellenállóképességéről, és bár viszonylag sok kutatás alanyaként szerepelt és több rezisztenciagént azonosítottak már belőle, számos olyan gént hordozhat még, amelyek a termesztett búza agronómiai tulajdonságainak javítására szolgálhatnak.

A munka során célul tűztük ki, hogy olyan 6B.6G transzlokációt hordozó búzatörzseket hozzunk létre, amelyek rendelkeznek a *T. timopheevii*-ből származó levélrozsda ellenállósággal, de mentesek az idegen kromoszómával bevezetett hátrányos agronómiai és minőségi tulajdonságoktól. Ennek elérése érdekében a következő kísérleteket végeztük:

1. A 6G kromoszóma gyors kimutatása és követése céljából a 6G(6B) szubsztitúciót hordozó „AMP12” törzs, a 6G kromoszóma donor növénye, a *T. timopheevii* és a búza 6B kromoszómája között polimorf mikroszatellit markerek keresése.
2. A polimorf és a nem polimorf markerek tesztelése 6B-nulliszóm genotípusokon a specificitás meghatározása érdekében.
3. A 6G és 6B kromoszómák közötti rekombináció indukálása céljából a Chinese Spring CO4 törzssel keresztezett, 6G(6B) szubsztitúciót hordozó („AMP12”) utódok egymást követő 3 nemzedékének vizsgálata polimorf mikroszatellit markerekkel a 6B és 6G kromoszómák közötti esetleges átépülések azonosítása érdekében.
4. A *T. timopheevii* kromoszómáinak azonosítása és kariotípusának meghatározása genomi és fluoreszcens *in situ* hibridizációval.
5. Az „AMP12” törzs 6G kromoszómájának azonosítása FISH-sel, repetitív DNS próbák segítségével.
6. A 6B.6G transzlokációt hordozó utódok vizsgálata *in situ* hibridizációval, összehasonlítása a 6G(6B) szubsztitúciót és a 6B kromoszómát tartalmazó utódokkal.
7. A 6G(6B) szubsztitúciót és transzlokációt hordozó utódok valamint a *T. timopheevii* génbanki tételek elemzése savas poliakrilamid gélelektroforézissel az idegen kromoszóma/kromoszóma-szegmentum azonosítása céljából.
8. A 6G(6B) szubsztitúciót hordozó („AMP12”) törzs és több martonvásári búzafajta keresztezéséből származó utódnövény vizsgálata a polimorf mikroszatellit markerekkel.
9. Az „AMP12”, a kontroll genotípusok és a 6B.6G transzlokációt hordozó ill. nem hordozó „AMP12” × Chinese Spring CO4 valamint az „AMP12” és több martonvásári búzafajta keresztezéséből származó utódok levélrozsdával szembeni ellenállóképességének vizsgálata mesterséges fertőzéssel üvegházban illetve szántóföldi körülmények között.

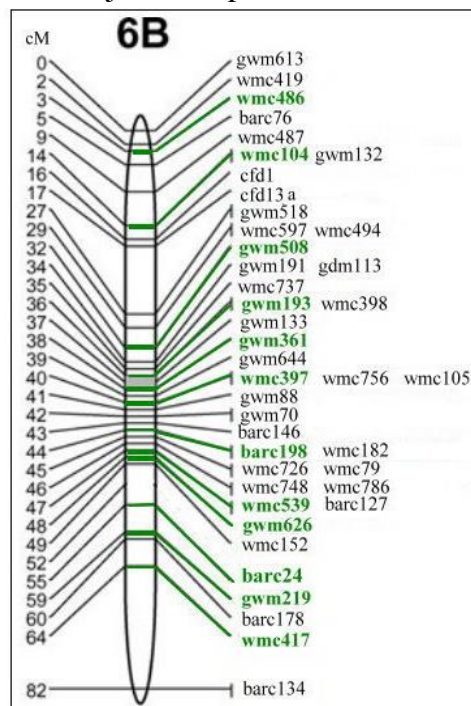
## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Növényi anyagok

1. *T. timopheevii* /*T. aestivum* 6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”): az „AMP12” búzatörzs a Fleischmann-481/*Triticum timopheevii* amfiploid Mironovszkaja-808 és Mv14 búzafajtával visszakeresztezett 42 kromoszómaszámú, lisztharmattal és levélrozsdával szemben rezisztens utóda.
2. *T. timopheevii* genotípusok: vizsgálatunk során tizenkét *T. timopheevii* genotípust használtunk a különböző kísérletekben.
3. A 6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”) × CO4 keresztezések utódai: az „AMP12” törzs és az *Ae. speltoides*-ből származó *Ph1* szuppresszor gént hordozó, Chinese Spring alapú búzatörzs (Chinese Spring CO4) keresztezéséből kapott utódnövények F<sub>3</sub>-tól F<sub>6</sub> nemzedékét vizsgáltuk.
4. Az „AMP12” és egyes maratonvásári búzafajták keresztezésének utódai.
5. Chinese Spring CO4 6B nulli-tetraszóm vonalak.
6. Kontroll növények [az „AMP12” törzs szülő fajtáit használtuk a különböző kísérletekben: Mv14, Fleischmann-481, Mironovszkaja-808, *T. timopheevii* (TRI677), *T. timopheevii* (MvGB573), valamint, a Chinese Spring CO4, Mv Magdaléna, Mv Palotás, Mv27-2000, Mv Emese, Mv Csárdás és Mv Mezőföld fajtákat használtuk a különböző vizsgálatok során].

### Molekuláris markerek tesztelése, PCR reakciók

A *T. timopheevii*, az „AMP12” és a búza kontrollokon teszteltünk 42 darab, az irodalmi adatok szerint a búza 6B kromoszómájára térképezett mikroszatellit markert (1. ábra).



1.ábra. A vizsgálat során alkalmazott mikroszatellit markerek elhelyezkedése a 6B kromoszómán.

## Citogenetikai módszerek

A citológiai preparátumokat a csírázó szemek gyökércsúcsaiból készítettük el. A mikroszkóp alatt ellenőrzött, megfelelő mitotikus indexszel rendelkező preparátumokat a felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

### *A próbák jelölése*

Az *in situ* hibridizációhoz teljes genomi DNS-t izoláltunk fiatal növények leveleiből fenol-kloroform alkalmazásával. A GISH-hez teljes genomi DNS-t izoláltunk rozsból, *Ae. speltoides*-ből és *T. urartu*-ból. A rozs (2n=14, RR) és a *T. urartu* (2n=14, A<sup>u</sup>A<sup>u</sup>) DNS-t digoxigenin-11-dUTP-vel jelöltük random priming módszerrel. Az *Ae. speltoides* Tausch. (2n=14, SS) DNS-t biotin-16-dUTP-vel jelöltük szintén random priming módszerrel. A FISH-hez a pSc119.2, az Afa family, a (GAA)<sub>7</sub> és a pTa71 repetitív próbákat használtuk. A próbákat a kombinációtól függően biotin-11-dUTP-val és a digoxigenin-16-dUTP-vel jelöltük.

### *Fluoreszcens in situ hibridizáció*

A hibridizációt megelőzően a kiválasztott preparátumokat RN-ázzal kezeltük, frissen készített pepszin oldatban emésztettük, majd lemostuk. A kromoszómákat ezután utófixáltuk, végül a preparátumokat növekvő koncentrációjú, jéghideg etanol sorozatban dehidratáltuk. A jelölt próbát és a blokkoló DNS-t is tartalmazó hibridizációs keverékkel a denaturálás után egy éjszakán át folytattuk a hibridizációt 37 °C-on. Ezt követően streptavidin-FITC és anti-digoxigenin-rodamin-nal inkubáltuk a tárgylemezeket. Az inkubálás után a lemezeket lemostuk és kontrasztfestékként DAPI-t tartalmazó fakulást gátló keverékkel fedtük le. A FISH-t követően a preparátumokat Zeiss Axioskop-2 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### *Genomikus in situ hibridizáció*

A GISH-t a *T. timopheevii* kromoszóma preparátumokon a FISH hibridizációs jelek lemosása után végeztük el. Az „AMP12” törzsön külön végeztük el a FISH-t és a GISH-t is. A *T. timopheevii* preparátumok esetében 70 ng jelölt A-genom specifikus próbát (*T. urartu*) valamint a próbák mennyiségéhez képest 200 × koncentrációban blokkoló DNS-t (*Ae. speltoides*) tartalmazott a keverék. Az „AMP12” törzsek esetében teljes rozs (*Secale cereale* L.) genomi DNS-t jelöltünk digoxigenin-11-dUTP-vel. Blokkolóként genomi búza (Mv9kr1) DNS-t alkalmaztuk a jelölt próba mennyiségéhez képest 35× koncentrációban.

### *Tartalékfehérje (gliadin) analízis egy dimenziós A-PAGE módszerrel*

A fehérje izolálás során a búzaszemek csíra részét levágtuk, majd az endospermiumot tartalmazó részt mozsárban liszté őröltük. A puffer hozzáadása után a mintákat akrilamid géltre vittük fel és vertikális futtatókádban futtattuk a gélt 10 °C-on, 10 percig 220V, 30mA 10W ellenállás mellett majd 2 óra 30 percig 550V, 70mA 38 W ellenállás mellett.

## *Üvegházi mesterséges rozsdafertőzés*

Az üvegházi mesterséges rozsdafertőzéses kísérleteknél uredospóra szuszpenzióval mesterségesen fertőztük a kiválasztott genotípusokat az „AMP12” × CO4 keresztezés F<sub>6</sub> és F<sub>5</sub> nemzedékéből illetve az előzetes, molekuláris markerekkel végzett vizsgálatok eredménye alapján a 6G kromoszómát hordozó „AMP12” × Mv27-2000, „AMP12” × Mv Csárdás, „AMP12” × Mv Magdaléna, „AMP12” × Mv Emese, „AMP12” × Mv Pálma, „AMP12” × Mv9 keresztezések F<sub>4</sub> nemzedékéből. Kontrollnak a Chinese Spring CO4, az „AMP12”, az Mv14 búzafajtát valamint az Mv Emese, Mv27-2000, Mv Csárdás, Mv Pálma és Mv Magdaléna fajtákat használtuk. A mesterséges inokulációhoz szükséges levélrozsa fertőzőanyagot fogékony növényeken állítottuk elő (Alcedo őszi búzafajta). A levélrozsa fertőzésre való fogékonyság vizsgálatát patotípus keverékkel végeztük. A fertőzéshez használt populáció avirulens az *Lr9* és *Lr19* gént hordozó differenciáló törzseken, nyomokban fertőzte az *Lr24*, *Lr28*, *Lr29* Thatcher alapú közel-izogén vonalakat és virulens 31 *Lr* génre, vagy allélre (*Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr22*, *Lr23*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr30*, *Lr32*, *Lr33*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr38*, *Lr44*).

A fertőzést két fejlődési fázisban, két ismétlésben végeztük el. Az első kísérletben 2 leveles állapotban lévő fiatal növényeket fertőztünk. A másik kísérletben a már vernalizáción átesett, Zadoks skála szerinti 13-as fejlettségű búzanövényeken végeztük el a fertőzést. A legelső leveleket fertőztük meg uredospóra szuszpenzióval, majd a fertőzés után 48 órán keresztül a gomba fejlődésének optimális körülményeket biztosítottunk. A növények fertőzöttségét a 12. és 20. napon értékeltük.

## *Szántóföldi természetes rozsdafertőződés*

Az „AMP12” törzset és számos „AMP12” × Chinese Spring CO4 utódot (F<sub>4</sub> és F<sub>5</sub> nemzedék) szántóföldön vetettünk el, hogy természetes körülmények között vizsgálhassuk a levélrozsdával szembeni ellenállóképességet. Közvetlenül az „AMP12” törzs mellé, valamint az egész vizsgált blokk köré fogékony búza genotípust vetettünk. A fertőzöttség mértékét 0-4 skála alapján felvételeztük (0=rezisztens, 4= teljesen fogékony).

## EREDMÉNYEK

### *Fenotípusos jellemzés*

Az „AMP12” kalásza jellegzetes orsó alakú, közepesen tömött, felső kalászkáin rövid szálcacsonkok találhatóak. A szülő búzafajták közül a Fleischmann-481, valamint a keresztezéshez használt *T. timopheevii* genotípus kalásza volt szálcás. Az „AMP12” × Chinese Spring CO4 keresztezés utódainak kalásztípusa nagy változatosságot mutatott. A túlnyomóan az „AMP12”-höz vagy a Chinese Spring CO4-hez hasonlító, többnyire tar kalászok mellett megjelentek szálcacsonkos, szálcás, rövid szálcás és két esetben a megnyúlt pelyvavevelű utódok is.

### *Mikroszatellit markerek polimorfizmus vizsgálata a 6B és 6G kromoszómákon*

A 6G és a 6B kromoszómák közötti polimorfizmus megállapításához a 42 mikroszatellit markert az Mv14, a CO4, az „AMP12” és *T. timopheevii* genotípusokon teszteltük először. A PCR reakciók optimalizálása után a 42 mikroszatellit marker közül 12 (wmc486, wmc104, gwm508, gwm193, gwm361, wmc397, barc198, wmc539, gwm626, barc24, gwm219, wmc417) bizonyult polimorfoknak a búza 6B és a *T. timopheevii* 6G kromoszómája között. Ezek közül 3 markert a 6B kromoszóma rövid karjára (wmc486, wmc104, gwm508), hármat a centroméra környékére (gwm193, gwm361, wmc397), hatot (barc198, wmc539, gwm626, barc24, gwm219, wmc417) pedig a kromoszóma hosszú karjára térképeztek.

### *A mikroszatellit markerek tesztelése 6B nulliszómás vonalakon*

A 6B kromoszómára térképezett markereket 6B nulliszóm vonalakon is teszteltük abból a célból, hogy a 6B kromoszómára való specifikusságuk megállapítható legyen. A vizsgálathoz nulli 6B-tetra 6D illetve nulli 6B-tetra 6A Chinese Spring vonalakat használtunk. A nulliszómiát előzetesen *in situ* hibridizációval ellenőriztük. Azok a mikroszatellit markerek, amelyek polimorfoknak bizonyultak a 6G és a 6B kromoszómákon, nem, vagy nem specifikus termékeket szaporítottak fel a nulliszóm vonalak mintáin, ami bizonyította azt, hogy a kiválasztott markerek a 6B kromoszómára specifikusak.

### *6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”) × CO4 utódnemzedékek elemzése mikroszatellit markerekkel*

Az „AMP12” törzs és a Chinese Spring CO4 *Ph1* szuppresszor gént hordozó vonal keresztezésével lehetővé válik az „AMP12” törzs 6G és a Chinese Spring 6B kromoszómájának rekombinációja és ezáltal a 6B.6G transzlokációk indukálása. A vizsgálatot 51 db, az F<sub>3</sub> nemzedékben levő utóddal kezdtük el. Az üvegházban elvetett és felnevelt növényeket az esetleges transzlokációk feltérképezése érdekében az előzetes vizsgálatok szerint polimorf mikroszatellit markerekkel teszteltük. Az előzőekben tárgyalt F<sub>3</sub> nemzedéket



követő F<sub>4</sub> generációt vetettük el az üvegházba. Az utódnövényeket szintén a polimorf mikroszatellit markerekkel teszteltük és kiválogattuk a markerekkel végzett vizsgálatok alapján transzlokációt tartalmazó példányokat. A 165 elvetett búzaszem közül 9 hordozott transzlokációt. Ez a 9 növény háromféle transzlokáció-típust hordozott az SSR markerekkel kapott eredmények alapján (1. táblázat). Az egyiknél a 6B kromoszóma-szegmentum a 6G kromoszóma hosszú karjának végére transzlokálódott (A és B), ezeknél a markerek a *T. timopheevii* 6G kromoszómájára jellemző sávot mutatták, és a wmc417 marker adott a búzára jellemző jelet. A C, D, I és E mintáknál a rövid kar egy része cserélődött ki a 6B kromoszómára. Ebben az esetben a wmc486, wmc104 és gwm508 markerek a búza 6B, a többi marker a *T. timopheevii* 6G kromoszómájára utaló mintázatokat mutatta. A harmadik típusnál (F, G, H) szintén a hosszú kar egy nagyobb darabja helyeződött át az eredeti 6G kromoszómára (1. táblázat). Ezeknél a gwm219 és a wmc417 markerek a búza 6B kromoszómájára, a többi a *T. timopheevii* 6G kromoszómáján specifikus termékeket szaporították fel.

1.táblázat. Az F<sub>4</sub> nemzedék 6B.6G transzlokációt hordozó genotípusainak polimorf mikroszatellit markerekkel feltérképezett kromoszóma-átrendeződései. A G a *T. timopheevii* 6G, a B a búza (Chinese Spring CO4) 6B kromoszómájára jellemző méretű terméket (vagy annak hiányát) jelzi.

Genotípus	Rövid kar			Centroméra			Hosszú kar					
	wmc486	wmc104	gwm508	gwm193	gwm361	wmc397	barc198	wmc539	gwm626	barc24	gwm219	wmc417
A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B
B	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B
C	B	B	B	G	G	G	G	G	G	G	G	G
D	B	B	B	G	G	G	G	G	G	G	G	G
E	B	B	B	G	G	G	G	G	G	G	G	G
F	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B	B
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B	B
H	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B	B
I	B	B	B	G	G	G	G	G	G	G	G	G

Az F<sub>4</sub> nemzedék transzlokációt hordozó utódainak kalászait izoláltuk majd a kalászutódok mindegyikét üvegházban, a transzlokációt nem tartalmazó növények magjait szántóföldi kísérletben vetettük el.

Az ezt követő nemzedékben a mikroszatellit markerekkel való tesztelés után az utódok 40%-a hordozta valamelyik transzlokáció típust. A G és H jelű mintáknál variálódott a transzlokálódott szegmentum nagysága.

A vizsgálataink során összesen 150, „AMP12” × Mv Magdaléna, „AMP12” × Mv Palotás, „AMP12” × Mv27-2000, „AMP12” × Mv Emese, „AMP12” × Mv Csárdás és

„AMP12” × Mv Mezőföld fajták keresztezéséből származó F<sub>3</sub> nemzedékű szemet is vetettünk az üvegházba. A 6B-6G kromoszómák között polimorf mikroszatellit markerekkel teszteltük, hogy a növények közül hány hordoz 6G(6B) szubsztitúciót. A 6G(6B) szubsztitúció a 2. táblázatban látható arányokban jelent meg.

2. táblázat. A 6G(6B) szubsztitúció megjelenése a 6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”) és több martonvásári búzafajta keresztezéséből származó F<sub>3</sub> nemzedékben.

kombináció	6G(6B) szubsztitúciót hordozó utódok száma (db)	Vizsgált összes növény (db)	kombináció	6G(6B) szubsztitúciót hordozó utódok száma (db)	Vizsgált összes növény (db)
„AMP12” × Mv Csárdás	5	30	„AMP12” × Mv Pálma	3	33
„AMP12” × Mv27-2000	4	16	„AMP12” × Mv Magdaléna	7	28
„AMP12” × Mv Emese	3	15	„AMP12” × Mv Mezőföld	8	28

*A 6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”), az Mv14, a Fleischmann-481 búzafajta és a T. timopheevii citogenetikai jellemzése*

A Fleischmann-481 és az Mv14 fajta FISH kariotípusát a pSc119.2, az Afa-family és a pTa71 repetitív próbákkal határoztuk meg. Az Mv14 a roszból származó 1BL.1RS transzlokációt hordozza. A *T. timopheevii* kromoszómáinak azonosításához először FISH-t majd GISH-t alkalmaztunk ugyanazokon a tárgylemezeken. A pSc119.2, az Afa-family és a pTa71 próbával lehetővé vált a *T. timopheevii* kromoszómák azonosítása. A 6G kromoszóma a többitől könnyen elkülöníthető az erős pTa71 és pSc119.2 hibridizációs jelek alapján. A pSc119.2 próba a 6G kromoszóma rövid- és hosszú karjának terminális részére hibridizált. Afa-family jelek a 6G kromoszóma szatellitjének szubterminális részén jelentek meg. A *T. timopheevii* kariotípus pontos kidolgozásához a (GAA)<sub>7</sub> repetitív próbát is felhasználtuk. Az „AMP12” a búza 6B kromoszómája helyett a *T. timopheevii* 6G kromoszómáját tartalmazza. A 6G kromoszómán megfigyelhető hibridizációs mintázat megegyezett a *T. timopheevii* 6G kromoszómáján megjelenő hibridizációs jelekkel. A 6G kromoszómán a (GAA)<sub>7</sub> repetitív próba mintázata nagyon hasonló a *T. timopheevii* 6G kromoszómáján megfigyelhető (GAA)<sub>7</sub> hibridizációs jelekhez.

Az „AMP12” a 6G(6B) szubsztitúción kívül az 1BL.1RS transzlokációt is tartalmazza, amelyet GISH-sel is azonosítottunk.

*A 6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”) × CO4 utódnemzedékeken végzett citogenetikai vizsgálatok*

Az „AMP12” × CO4 keresztezések F<sub>5</sub> nemzedékének molekuláris markerekkel történő tesztelése után a transzlokációkat hordozó illetve transzlokációt nem hordozó (teljes 6G vagy 6B kromoszómát tartalmazó) növények F<sub>6</sub> nemzedékét FISH-sel vizsgáltuk. Kontrollnak a Chinese Spring CO4-et, a *T. timopheevii* (TRI677) genotípust és az Mv14 fajtát választottuk.

A FISH-hez a pSc119.2, az Afa-family, a pTa71 és a (GAA)<sub>7</sub> repetitív próbát használtuk.

Számos mintában a 6G-nek feltételezett kromoszómákon a pSc119.2 próba hibridizációs mintázatában különbség jelentkezik. A *T. timopheevii* 6G kromoszómájának szatellit részén terminálisan két pSc119.2 hibridizációs jel látható, de egyes mintáknál nem jelenik meg ez a jel. A kontrollként használt Chinese Spring CO4 6B kromoszómájának rövid karján szintén nem jelenik meg ez a terminális pSc119.2, ami a búzafajták többségétől eltérő hibridizációs jegy. Tehát azoknál az „AMP12” × CO4 mintáknál, amelyekben a szatellit terminális részére a pSc119.2 próba nem hibridizálódott, vélhetően a 6G kromoszóma rövid karjának egy része a Chinese Spring CO4 6B karjára cserélődött ki. Azokban a mintákban, amelyek nem a rövid, hanem a hosszú karokon hordozzák a transzlokációt, a pSc119.2 próba a szatellit terminális részén ugyanolyan hibridizációs jelet adott, mint a *T. timopheevii* esetében. A 6B.6G és az „AMP12”-ből származó 1BL.1RS transzlokáció a Chinese Spring CO4-gyel való keresztezés után is megmaradt vagy kiesett vagy heterozigóta formában jelent meg az utódokban.

#### *A citogenetikai és a molekuláris markerekkel végzett elemzés összevetése*

Az „AMP12” × CO4 keresztezés F<sub>6</sub> nemzedékéből citogenetikai módszerekkel tesztelt utódok közül kiválasztottunk a FISH eredmények szerint 6B.6G transzlokációt hordozó, illetve csak 6G(6B) szubsztitúciót vagy a 6B kromoszómát tartalmazó utódokat. Ezek magjait a FISH-hez szükséges gyökerek levágása után tovább neveltük és a 14 napos csíranövényekből DNS-t izoláltunk. A 12db, 6G és 6B kromoszómák között polimorf markerrel teszteltük a mintákat. A 6B.6G transzlokáció FISH-sel azokban a növényekben mutatható ki, amelyekben a transzlokáció a rövid kar egy részét érinti. Ezeknél a molekuláris markerekkel végzett vizsgálatok alátámasztották a FISH mintázat eredményeit.

#### *Gliadin frakció elemzése*

A savas poliakrilamid gélelektroforézis során összehasonlítottuk az „AMP12” törzs, a Chinese Spring CO4 illetve az ezek keresztezéséből származó 25, F<sub>5</sub> nemzedékű „AMP12” × CO4 utód tartalékfehérje mintázatát. Emellett az „AMP12” törzs kialakítása során használt fajtákat (MIR808, Fleischmann-481) illetve az „AMP12” × Mv Csárdás és „AMP12” × Mv27-2000 keresztezésének 6G(6B) szubsztitúciót hordozó utódait, összesen 38 mintát vizsgáltunk. Mivel a 6B kromoszómát érintő szubsztitúciót/transzlokációt jelző mintázatot kerestük, ezért az alfa/béta-gliadinok régióját vizsgáltuk. A biztosan 6G(6B) szubsztitúciót hordozó minta alfa/béta-gliadin sávjai alapján azonosítható a 6G kromoszóma szubsztitúció, azonban a 6B.6B transzlokáció azonosítása egy dimenziós karbamidos savas gélben nem járt sikerrel.

### *A transzlokációt hordozó utódok levélrozsdával szembeni rezisztenciájának vizsgálata*

Kísérletünkben a 6B.6G transzlokációt hordozó „AMP12” × CO4 F<sub>6</sub> utódokat két eltérő fejlődési fázisban vizsgáltuk: az egyik csoportba a 6 hetes vernalizációs periódus után cserepekbe ültetett idősebb, a másik csoportba pedig 2 leveles fiatal növények tartoztak.

#### *Üvegházi mesterséges levélrozsdafertőzések*

A nem vernalizált csoport növényei között rezisztens és fogékony egyedeket is megfigyeltünk. Felvételezéseinket a fertőzéstől számított 12. és 20. napon végeztük. Az „AMP12” törzs mindegyik ismétlésben nagyon ellenállónak bizonyult a levélrozsdával szemben, ugyanakkor a kontrollnak használt Mv14 és Chinese Spring CO4 növények fogékonyak vagy mérsékelten fogékonyak bizonyultak.

A vizsgált 41 genotípusból 29 db, 6-féle 6B.6G transzlokáció típust tartalmazó „AMP12” × CO4 utódok többsége nagyon ellenálló illetve ellenálló volt a fertőzéssel szemben a második felvételezési időpontban is (maximum 2-es értéket kaptak), illetve 6 növény mérsékelten fogékony és fogékony volt. A 3 db, 6G(6B) szubsztitúciót hordozó utódok közül egy, továbbá valamennyi, kizárólag a 6B kromoszómát tartalmazó utód fogékony volt.

Az „AMP12” és egyes maratonvásári búzafajták közötti keresztezések utódai ellenállóbbak voltak a rozsdafertőzéssel szemben, mint a felhasznált kontroll fajták (Mv Csárdás, Mv Magdaléna, Mv Emese).

A vernalizált csoportban végzett a kísérletnél a levélrozsdafertőzöttség értékeléseket szintén a 12. és a 20. napon végeztük. Az „AMP12” törzs nagyon ellenálló volt, a *T. timopheevii* kontrollok teljesen immunisnak bizonyultak. Az Mv14 és a Chinese Spring CO4 fogékony és mérsékelten fogékony volt. A vizsgált 42 genotípusból 29db, 6B.6G transzlokációt hordozó genotípus közül 8 volt mérsékelten fogékony, vagy fogékony és 19 volt ellenálló, vagy nagyon ellenálló. A fogékony genotípusok esetében már az első felvételezési időpontnál erősebb fertőzöttség volt megfigyelhető. A 6G kromoszómát tartalmazó „AMP12” × CO4 utódok közül egy volt nagyon fogékony, a csak 6B kromoszómát hordozó törzsek szintén érzékenyebbek bizonyultak a többi utódnál.

#### *Szántóföldi természetes fertőzések*

Szántóföldi körülmények között az „AMP12” törzs a bokrosodástól kezdve egészen a viaszerésig ellenálló volt a levélrozsdafertőzéssel szemben. Az érés közeledtével ugyan néhány uredospóra telep megjelent az alsó leveleken, de a zászlós levélen nem jelentek meg a telepek, csak a levél öregedése idején. Az „AMP12” törzs mellé ültetett fogékony genotípus az egész vegetációs időben erősen fertőzött volt levélrozsdával.

A szántóföldi levélrozsdával szembeni ellenállóképesség mértékét az AMP12×CO4 keresztezés 6G(6B) szubsztitúciót hordozó F<sub>4</sub> nemzedéken vizsgáltuk. Az utódok többsége ellenállóbb volt a fogékony MIR808, Fleischmann-481 és Mv14 szülő búzafajtáknál, és számos egyed ellenállóképessége az AMP12-vel egyezett meg.

## ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A búza 6B kromoszómájára térképezett mikroszatellit markerek közül 42 marker konvertálhatóságát mértük fel a *T. timopheevii* 6G kromoszómáján. A 42 marker közül 12 polimorf volt a 6G és a 6B kromoszóma között, ezek használhatók a 6G kromoszóma vagy kromoszóma-szegmentum követésére az egymást követő nemzedékekben.
2. A *T. timopheevii* kromoszómákat azonosítottuk a pSc119.2 próba mellett az Afa-family és a (GAA)<sub>7</sub> repetitív próbával. A *T. timopheevii* 4G kromoszómáján Afa-family próbával azonosítottuk a ciklikus transzlokáció során a 4G rövid karjára épült 6At kromoszóma-szegmentumot.
3. FISH során használt pSc119.2, Afa-family és (GAA)<sub>7</sub> próbával elkülönítettük a 6G és 6B kromoszómákat.
4. A polimorf molekuláris markerek és a FISH használatával azonosítottuk a 6G kromoszómát búza genomi háttérben is.
5. A *T. timopheevii* 6G kromoszómáját hordozó 6G(6B) szubsztitúciós törzs („AMP12”) és a *Ph1* szuppresszor gént tartalmazó Chinese Spring CO4 keresztezéséből származó utódok közül a polimorf mikroszatellit markerekkel azonosítottuk a 6B.6G transzlokációt hordozó egyedeket.
6. FISH alkalmazásával is kimutattuk a 6B.6G transzlokációk közül a 6B és a 6G rövid karok kicserélődésével létrejött átrendeződéseket.
7. Üvegházban és szántóföldön végzett, a 6B.6G transzlokáció típusokat és a 6G(6B) szubsztitúciót hordozó utódok levélrozsda fertőzéssel szembeni ellenállóképességét vizsgáló kísérletünkből kiderült, hogy a rezisztencia és a *T. timopheevii* 6G kromoszómájának jelenléte közötti kapcsolat egyértelmű.

## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

1. A búza 6B kromoszómájára térképezett mikroszatellit markerek nagy része konvertálható a *T. timopheevii* 6G kromoszómájára. A 42 marker közül 5 méretbeli különbséget mutat a 6B és a 6G kromoszómák között. A null-allélként jelen levő 7 másik markerrel együtt tehát 12 mikroszatellit marker alkalmas arra, hogy a *T. timopheevii* 6G kromoszómájának vagy kromoszóma-szegmentumának jelenlétét azonosítsuk búza genomi háttérben.

2. FISH-sel is azonosítható a 6G kromoszóma búza háttérben. A 6B.6G transzlokációkat a B és G-genomok közti homeológia miatt genomi in situ hibridizációval nehézkes kimutatni. Azokban a 6B.6G transzlokációs utódokban, amelyekben a 6G kromoszóma szatellitje és a rövid kar egy része cserélődött ki a 6B kromoszómára, FISH-sel is azonosítani lehetett a kromoszóma átrendeződését. Azonban több utód a transzlokációt tekintve heterozigóta volt, amit a domináns mikroszatellit markerekkel nem lehetett kimutatni. Az ilyen típusú transzlokációt homozigóta formában hordozó utódok elkülönítéséhez tehát a mikroszatellit markerek és a FISH együttes alkalmazása szükséges. A savas poliakrilamid gélelektroforézis során specifikus sávokat eredményező gliadin tartalékfehérjék elválasztásával vizsgálatainkban csak a szubsztitúciók kimutatása vált lehetővé. A pontosabb, transzlokációkat is kimutató eredményhez jobb felbontású gélen kell futtatni a mintákat illetve a tényleges szülőnövényekből vett növényi anyagokra van szükség.

3. A pSc119.2, Afa-family/(GAA)<sup>7</sup> és a pTa79 repetitív próbák kombinálásával azonosíthatók a *T. timopheevii* kromoszómák. A fajspecifikus intergenomikus transzlokációk közül a FISH-sel csupán a 4G kromoszómára épült 6At figyelhető meg. A mikroszatellit markerekkel és FISH-sel polimorfizmust nem mutató *T. timopheevii* génbanki tételek között a GISH-sel vizsgálhatók az esetleges eltérő kromoszóma-átépülések.

4. A Chinese Spring CO4 a kromoszómák homeológ párosodását erősen kontrolláló Ph1 gén szuppresszorát tartalmazza, ezért a vele végzett keresztezések utódaiban a homeológ kromoszómák közti párosodás így lehetővé válik, valamint kialakulhatnak a 6G-6B kromoszómák közötti rekombináns utódok. Ezek utódnövények azonban hordozhatják ezt a szuppresszor gént, aminek következményeként további kromoszóma-átrendeződések jöhetnek létre. A hasznos gént hordozó transzlokációs törzsekben tehát visszakeresztezésekkel illetve dihaploid vonalak kialakításával kell törekedni arra, hogy a transzlokáció stabil maradjon az utódokban.

5. Az „AMP12” törzs a mesterséges és szántóföldi levélrozda fertőzésekkel szemben ellenálló volt. Mérsékelt fertőzés a kalászolás ideje után alakult ki rajta. Mivel a nemesítésében felhasznált fajták (MIR808, Fleischmann-481, Mv14) szántóföldi körülmények között igen fogékonyak mutatkoztak, feltételezhető volt, hogy a 6G kromoszómához köthető megnövekedett ellenállóképesség. Ezt támasztották alá a *Triticum timopheevii*-ből származó 6G kromoszómát vizsgáló hasonló kutatások eredményeit publikáló más szerzők is. A

Chinese Spring CO4-el történő keresztezésből származó utódok között változó volt a levélrozsdával szembeni ellenállóképesség vagy fogékonyság mértéke, de a kontroll fajták fogékonyságának szintjét csak nagyon kevés esetben érték el. Az üvegházi mesterséges fertőzésekben a különböző méretű és elhelyezkedésű 6B.6G transzlokációt hordozó utódoknak ugyan több, mint 70%-a ellenálló volt a gombával szemben, de a fennmaradó 30% fogékony illetve nagyon fogékony volt. A szántóföldi kísérletben elvetett utódoknak csak az előző generációját vizsgáltuk és ezek között lehettek heterozigóták a 6G kromoszóma jelenlétére vonatkozóan. A nagyon fogékony Chinese Spring CO4-gyel való keresztezés után a 6G-6B kromoszóma átrendeződés mellett más kromoszómák is kicserélődhetett, aminek eredményeként az ellenállóság csökkenése jelenhetett meg több esetben. Mivel fenotípusos jegyek alapján nem lehet megállapítani, hogy az adott növény melyik kromoszómát hordozza, ennek megállapítása csak utólag lehetséges. A FISH-sel és mikroszatellit markerekkel ellenőrzött 6B.6G és az 1BL.1RS transzlokációkra nézve homo- és heterozigóta utódok betegségekkel szembeni ellenállóképességét érdemes tovább tesztelni. Az „AMP12” törzs rezisztenciáját még vizsgálandó komplex hatások eredményezhetik. A Chinese Spring CO4 feltételezhető hátrányos hatásai kivédhetők lennének visszakeresztezésekkkel illetve dihaploid vonalak előállításával. Ionizáló sugárzás alkalmazásával is előidézhető volna a 6G kromoszóma törése – és ezáltal 6G.6B transzlokációk kialakulása – azonban ennek a módszernek a hátránya az, hogy egyéb, nem homeológ kromoszómák közötti átrendeződések is létrejöhetnek.

## A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓS TEVÉKENYSÉGE

### Tudományos publikációk

#### *Nemzetközi tudományos lapokban megjelent publikációk*

Vida G., Gál M., **Uhrin A.**, Veisz O., Syed N.H., Flavell A.J., Wang Z., Bedő Z. (2009): Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* 170:67-76. IF: 1,405

**Uhrin A.**, Szakács É., Láng L., Bedő Z., Molnár-Láng M. (2012): Molecular cytogenetic characterization and SSR marker analysis of a leaf rust resistant wheat line carrying a 6G(6B) substitution from *Triticum timopheevii* (Zhuk.) *Euphytica* 186: 45-55. IF: 1,554

#### *Hazai tudományos lapokban megjelent publikációk*

Gál M., Vida G., **Uhrin A.**, Bedő Z., Veisz O. (2007): Incorporation of leaf rust resistance genes into wheat genotypes using marker-assisted selection. *Acta Agronomica* 55:149-156.

**Uhrin A.**, Láng L., Bedő Z. (2008): Comparison of PCR-based DNA markers for using different *Lr19* and *Lr24* leaf rust resistance. *Cereal Research Communications* 36: 533-541.

Wang Z., Láng L., **Uhrin A.**, Veisz O., L., Shudong Vida Gy. (2009): Characterization of the *Lr34/Yr18* rust resistance gene region in a Hungarian wheat breeding programme. *Cereal Research Communications* 37: 431-440.

**Uhrin A.**, Szakács É., Vida Gy., Sepsi A., Lángné-Molnár M., Láng L., és Bedő Z. (2009): Levélrozsa-ellenállóságért felelős géneket hordozó idegen fajú kromoszómaszegmentumok kimutatása a martonvásári nemesítési programban. *Növényvédelem* 45: 681-687.

Vida Gy., Gál M., **Uhrin A.**, Karsai I., Veisz O., Láng L., Bedő Z. (2009): A molekuláris markerszelekció felhasználása a búza levélrozsa-rezisztenciára nemesítésében. *Növényvédelem* 45: 668-675.

### Egyéb tudományos művek

#### *Konferencia kiadványok (proceeding)*

**Uhrin A.**, Vida Gy., Gál M., Láng L., Bedő Z. (2006): Marker-assisted selection for leaf rust resistance gene *Lr37* in the Martonvasar breeding programme. *Cereal Research Communications* 34: 89-91 (Alpok-Adria Tud. Együttműködés)

László E., Puskás K., **Uhrin A.**, (2009): Molecular characterisation of *Fusarium* head blight resistance in the BKT9086-95/Mv Magvas wheat population. *Cereal Research Communications* 37: 333-336 (Alpok-Adria Tud. Együttműködés)

**Uhrin A.**, Szakács É., Láng L., Bedő Z., Molnár-Láng M. (2011): FISH characterization of a wheat line carrying leaf rust resistance from *T. timopheevii*. *AgriSafe Final Conference: Climate Change: Challenges and Opportunities in Agriculture*. 03.21-23, 2011., pp 122-124.

**Uhrin A.**, Lángné Molnár M. (2008): Vad rokon fajok szerepe a búza genetikai variabilitásának növelésében. *Pannon Tudományos Napok, Nagykanizsa, 2008. 10.15.*, pp 83-89.



**Uhrin A.,** Láng L., Lángné Molnár M., Bedő Z. (2009): Búza és *T. timopheevii* kromoszóma poliformizmus vizsgálata molekuláris markerekkel. In: (Matuz J., Veisz O.) Hagyomány és haladás a növénynemesítésben. XV. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA, Bp. 2009. 03. 17., pp 512-516.

*Konferencia absztrakt*

**Uhrin A.,** Lángné Molnár M., Szakács É., Láng L., Bedő Z.(2010): A *Triticum timopheevii* (Zhuk.) 6G kromoszómájának kimutatása búza szubsztitúciós vonalban molekuláris markerekkel és citológiai módszerekkel. XVI. Növénynemesítési Tudományos Napok, MTA, Bp. 2010. 03. 11., p 139

**Uhrin, A.,** Szakács, É., Láng L., Lángné Molnár M. (2011): Egy *Triticum timopheevii*-ből származó kromoszóma szubsztitúciót hordozó, levélrozsdá rezisztens búzavonal vizsgálata. XXI. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum. Keszthely, Pannon Egyetem, 2011.01.26-28.

*Tudományos könyvfejezet*

Vida Gy., Gál M., Károlyi-Cséplő M., László E., Puskás K., Pribék D., Karsai I., Szunics L., **Uhrin A.,** Bedő Z., Láng L., Veisz O. (2009): Őszi búza genotípusok betegségellenállóságának javítása hagyományos és molekuláris módszerekkel. In: Veisz O (szerk.): A martonvásári agrárkutatások hatodik évtizede.: 1999-2009. Martonvásár: MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet, 2009.pp. 65-70. (ISBN:978-963-8351-35-7)