



**Gabonafélék hidegadaptálódását befolyásoló gének  
térképezése és molekuláris markerezése**

*Doktori értekezés tézisei*

*Tóth Balázs*

*Gödöllő*

**2003.**

**Doktori iskola:** Növénytudományi Doktori Iskola

**Vezetője:** Dr. Virányi Ferenc  
egyetemi tanár, MTA doktora  
SZIE, Növényvédelem Tanszék

**Tudományága:** Növénytermesztési és kertészeti tudományok

**Program:** Növénynevelés Genetikai és Biotechnológiai  
Módszerekkel

**Programvezető:** Dr. Heszky László  
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA levelező tagja  
SZIE, Genetika és Növénynevelés Tanszék

**Témavezető:** Dr. Galiba Gábor  
tudományos osztályvezető, az MTA doktora

.....  
Dr. Heszky László  
programvezető

.....  
Dr. Galiba Gábor  
témavezető

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A gabonafélék télállóságának növelése az új fajták létrehozásának egyik fontos szempontja, mivel a hazánkban termesztett gabonák nagy része őszi vetésű, és a jó terméshez túl kell élniük a telet. A télállóság folyamatainak megértését nagyban segíthetik az egyre részletesebb genetikai és fizikai térképek, melyek segítségével a télállóságért felelős gének helye pontosan meghatározható a genomban. Így lehetővé válik ezeknek a géneknek a klónozása, illetve génspecifikus PCR-alapú markerek gyakorlati felhasználása markerek segítségével történő szelekcióra (marker assisted selection, MAS).

A dolgozat két fejezete térképezési munkákat és fagyűrő genotípusok gyors szelekciójára alkalmas markerek vizsgálatát mutatja be búzában és árpaiban.

### 1.1. Virágzási időt és fagyűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

Hazánk legfontosabb élelmiszeripari növénye a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.), 2001-ban 1,198 millió hektáron, míg 2002-ben 1,106 ezer hektáron termesztették (KSH adatok). A klimatikus viszonyok miatt Magyarországon szinte kizárólag az őszi búzát termesztik, mert ez mintegy 30 – 40 %-kal nagyobb termést eredményez, mint a tavaszi búza.

Az őszi vetésű növényeknek egy nagyon kritikus periódust kell átvészelnük: a telet. A jó termés érdekében a búzanemesítés egyik fontos feladata tehát a télálló fajták előállításának. A télállóság legjelentősebb komponensei közé tartozik a fagyállóság, vagy más néven fagyűrés, és a vernalizációra való érzékenység. A fagyállóság kialakulásához a növényeknek edződnie kell. E folyamat alatt olyan adaptív biokémiai, élettani változások történnek, melyek felkészítik a növényt a fagy eltűrésére. Természetes körülmények között az edződés ősszel, csökkenő hőmérséklet és rövidülő nappalhossz mellett megy végbe. A vernalizáció szintén ősszel játszódik le, amikor a növény huzamosabb ideig alacsony hőmérsékleten van. Ez a periódus elengedhetetlen az őszi gabonafélék tavaszi virágzásához. Ezek a folyamatok modellezhetők, és így lehetőség van mesterséges viszonyok között is az edződés, fagyás és vernalizáció során lejátszódó folyamatok tanulmányozására. Bár a fagyállóság poligén tulajdonság, néhány génnek meghatározó a jelentősége. Így például a búza esetében az 5-ös homeológ csoport kromoszómáin levő gének bizonyultak a fagyűrés meghatározásában a legfontosabbnak.

Vizsgálataink célja a búza 5B kromoszómáján elhelyezkedő vernalizációs igényért felelős-, koraisági-, és fagyűrési gének genetikai térképezése volt.

### 1.2. PCR alapú markerek kifejlesztése fagyűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

A meglevő térképezési adatok gyakorlati felhasználásának az egyik módja lehet az egyes jellegekhez kapcsolt markerek alkalmazása az adott tulajdonságra

történő szelekcióra. A molekuláris markerek alkalmazása a növénynevelésben nemcsak gyorsabb és olcsóbb, mint a hagyományos eljárások, de bizonyos esetekben az egyetlen hatékony módszer a szelekcióra. Dél-Európában rendszertelen időközönként előfordulnak  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-15^{\circ}\text{C}$ -os fagyok is, így egy nevelési programban az abban az évben elvetett teljes árpa populáció elveszhet, mivel hagyományos úton nem lehet a fagyűrő genotípusokat kizselektálni. Ilyen esetekben szükséges lehet a molekuláris markerek alkalmazása a fagyűrő genotípusok szelekciójára. Továbbá, tavaszi jellegű, fagyűrő gabonák szelektálására is alkalmas a molekuláris markerek segítségével végzett szelekció.

A 90-es években a gabonafélék stressztűrését, így a fagyállóságát meghatározó gének pozícióját RFLP térképezéssel határozták meg. Az RFLP azonban kevésbé alkalmas szelekcióra, mivel nagy mennyiségű, tiszta DNS-sel végezhető, és viszonylag nagy a költség- és munkaigénye. Ezért határoztuk el fagyűrésért felelős régiókra térképezett RFLP próbák PCR-alapú markerré való átalakítását, mivel kis munkaigénye, alacsony költségei, nagy áteresztőképessége miatt alkalmasak nagy mintaszámú nevelési populáció gyors szelektálására.

Kísérleteinkben a gabonafélék 5-ös homeológ kromoszómáinak a fagyűrésért felelős régióira térképezett RFLP markerek PCR-alapú markerekké átalakítását, illetve egyéb – fagyűrő genotípusok szelekciójára használható – PCR alapú markerek árpában történő tesztelését és térképezését tűztük ki célul.

## 2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 2.1. Virágzási időt és fagyűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

#### 2.1.1. Térképezési populációk

Kísérleteinkhez két búza térképezési populációt használtunk. Az első térképezési populáció 61 darab egy kromoszómára rekombináns vonalból áll, melyek Chinese Spring (CS) és a Chinese Spring (Cheyenne 5B) szülők keresztezéséből származnak. A másik térképezési populáció 76 egy kromoszómára rekombináns vonalból áll, mely a Hobbit és Hobbit (Chinese Spring 5BL) szülőktől származik.

#### 2.1.2. Virágzási idő meghatározása

A Chinese Spring (CS) és Chinese Spring (Cheyenne 5B) szülők keresztezéséből származó térképezési populáció esetében a Chinese Spring genetikai háttér miatt minden vonal hordozza a tavaszi *Vrn-D1* allélt az 5D kromoszómán, ezért minden rekombináns vonal virágzik vernalizáció hiányában is. A virágzási időben meglevő különbségek főként a *Vrn-B1* allélvariációinak tulajdoníthatók, ugyanis a Chinese Spring 5B kromoszóma vernalizációra érzéketlen (lévén tavaszi búza), *Vrn-B1* allélt hordoz, míg a Cheyenne 5B kromoszóma vernalizációra érzékeny (lévén őszi búza), *vrn-B1* alléllal rendelkezik. Ennek megfelelően minden rekombinánsból 10 vernalizálatlan növényt, illetve a szülői kontrollokat neveltünk növénynevelő kamrában, 16/8 órás világos/sötét ciklusban; 20°C-on, random elrendezésben. Ezzel szemben, teljes vernalizációt követően a virágzási időben levő különbségek vernalizációra érzéketlen lókuszok hatásának tulajdoníthatók (koraisági lókuszok). Az 5B kromoszómán elhelyezkedő koraisági lókuszok kimutatására a Hobbit (Chinese Spring 5BL) rekombináns szubsztitúciós vonalak mindegyikéből 5 vernalizált (6 hétig 6 °C-on, 8/16 órás nappal/éjszaka ciklusban nevelt) növényt, illetve a szülői kontrollokat neveltünk növénynevelő kamrában, 16/8 órás világos/sötét ciklusban; 20°C-on, random elrendezésben. Minden egyes növényen felvételztük a virágzási időt, amit a vetéstől, az első kalász kibújásáig számított napok száma ad meg.

#### 2.1.3. Hidegedzés és a fagyállóság tesztelése

A Chinese Spring és Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáció (57 vonal) hidegtűrésének tesztelését Sutka (1981) által kidolgozott módszer szerint végeztük, vonalanként 10 növényrel, randomizált elrendezésben. A növények fagyasztását -11, és -12°C -on végeztük, majd regeneráció után bonitáltuk 0-tól 5-ig terjedő skálán, ahol az 5-ös érték a teljes regenerációnak felelt meg.

#### 2.1.4. DNS izolálás

A térképezési populáció tagjaiból növényenként 5 g friss tömegű levélmintát használtunk DNS izolálás céljára. A leveleket folyékony nitrogénben finom porrá dörzsöltük, hagyományos módszerrel (SDS, Proteináz K, RN-áz) izoláltuk a genomi DNS-t.

#### 2.1.5. Mikroszatellit analízis

Az 5B kromoszóma genetikai térképét SSR markerek segítségével készítettük el a CS x CS(Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, míg a Hobbit x Hobbit (CS 5BL) keresztezésből származó térképezési populáció esetében SSR és RFLP markereket használtunk. A PCR reakciót 15 µl végtérfogatban végeztük, amely 1,5 µl 10x PCR puffert, 0,45µl 50mM-os MgCl<sub>2</sub>-ot, 1 µl 2mM-os dNTP-t, 1,5µl 2µM-os mikroszatellit primer keveréket, 0,35 unit Taq polimerázt és 100 ng templát DNS-t tartalmazott. Az egyes primer párokhoz tartozó PCR paramétereket és primer kapcsolódási hőmérsékleteket a markerek kifejlesztőinek korábban publikált adatai szerint alkalmaztuk (Röder és mtsai. 1998). A PCR termékeket szekvenálógélen választottuk el, és ezüstfestéssel detektáltuk standard módszer szerint.

#### 2.1.6. Kapcsoltsági térkép készítése és QTL analízis

A kapcsoltsági térképet JoinMap programmal állítottuk össze. A QTL analízist QTL Cafe, illetve MapQTL szoftver segítségével végeztük.

A számítógépes adatok ellenőrzése céljából szintérképezést végeztünk a Kiss és mtsai. (1998) által leírt módszer alapján.

### 2.2. PCR-alapú markerek kifejlesztése fagyűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

#### 2.2.1. Növényi anyag

Kísérleteinket különböző fagyűrésű őszi és tavaszi árpa fajtákon és vonalakon végeztük, melyeket a Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura (Fiorenzuola, Olaszország) genotípus gyűjteményéből válogattunk össze. Az általunk vizsgált genotípusok kiválasztása korábban elvégzett több éves szántóföldi tesztek alapján történt, melyek során meghatározásra kerültek a genotípusok növekedési jellegei, ill. fagyűrésük. A kiválogatásuk úgy történt, hogy egyaránt vannak köztük fagyűrő (15 db), és fagyérzékeny (13 db) genotípusok. A teszt kollektió összeállításánál figyeltünk arra is, hogy két-, és hatsoros genotípusok egyaránt szerepeljenek benne, illetve szerepeljenek benne fajták, tájfajták, nemesítési vonalak, és az egyes genotípusok eredete is különböző legyen.

#### 2.2.2. Fenotipizálás ( $F_v/F_m$ paraméter meghatározása)

A növények II. fotokémiai rendszerének (PSII) fagyás által okozott működésbeli változását a PSII maximális kvantumhatásfokának meghatározásával állapítottuk meg, mely a sötétadaptált növény változó ( $F_v$ ), és maximális ( $F_m$ )

fluoreszcenciájának aránya ( $F_v/F_m$ ). A méréseket Rizza és mtsai (2001) által leírt módszer szerint végeztük 3 ismétlésben PAM2000 típusú fluorométerrel. A módszer alkalmasságát a fagyűrész indirekt meghatározására zab esetében mutatták ki Rizza és mtsai (2001), ill. nem publikált adataink szerint árpában is jó korreláció volt megfigyelhető a fagyűrész és az  $F_v/F_m$  értékek között.

### 2.2.3. DNS izolálás

A DNS izoláláshoz 300 mg friss levelet használtunk három hetes árpa növényekből. A leveleket folyékony nitrogénben finom porrá törtük, majd totál DNS-t izoláltunk Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction kit felhasználásával, a gyártó útmutatásait követve.

### 2.2.4. Primer tervezés és PCR analízis

Kísérleteinkben 16 RFLP markert használtunk, melyeket a búza 5A, és az árpa 5H kromoszómáján az *Rcg1*, illetve az *Fr1* régiókra térképezték. A szekvencia adatok felhasználásával specifikus, 20-27 bp hosszúságú, primerpárokat terveztünk.

A PCR reakciókat 20  $\mu$ l végtérfogatban végeztük, amely 1,5 mM  $MgCl_2$ -ot, 0,25 mM dNTP-t, 0,2  $\mu$ M primert, 0,25 U Taq polimerázt, 1x PCR puffert és 20 ng templát DNS-t tartalmazott. A reakciókat 6 perc 94°C-os denaturációval kezdtük, amit 35 PCR ciklus követett (94°C, 1 perc; 55°, vagy 60°C, 1 perc; 72°C, 1 perc), végül 6 perces terminális DNS szintézis következett 72°C-on. Az amplifikációs termékeket 2,5%-os agaróz gélen választottuk szét.

### 2.2.5. RAPD analízis

Vizsgálataink során, genotípus gyűjteményünkön teszteltük az *OPA17* RAPD markert is. A PCR reakciót 20  $\mu$ l végtérfogatban végeztük, amely 2  $\mu$ l 10x PCR puffert, 0,6  $\mu$ l 50 mM  $MgCl_2$ -ot, 0,2  $\mu$ l 10 mM dNTP-t, 0,3  $\mu$ l 10  $\mu$ M *OPA17* RAPD primert (5'-GACCGCTTGT-3'), 0,2  $\mu$ l 5U/ $\mu$ l Taq polimerázt, és 20 ng templát DNS-t tartalmazott. Két perces 94°C-os denaturáció után, 46 PCR ciklus következett (94°C, 1 perc; 30°C, 1 perc; 72°C, 2 perc), majd 10 perc 72°C-os terminális DNS szintézis. A PCR termékeket 2,5%-os agaróz gélen választottuk szét.

### 2.2.6. PCR termékek genetikai térképezése

A *wg644* és a *psr637* polimorf STS markereket, illetve az *OPA17* RAPD markert árpán térképeztük, hogy a kromoszómális lokalizációjukat meghatározzuk. Ebből a célból, a felszaporított polimorf DNS fragmenteket 136 árpa dihaploid vonalon teszteltük, melyek a Nure x Tremois keresztezésből származtak. A kapcsoltsági térképet a MAPMAKER szoftvercsomag DOS 3.0 verziójával végeztük, és küszöbértékként 3.0-as minimum LOD értéket használtunk.

### 3. EREDMÉNYEK

#### 3.1. Virágzási időt és fagyűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

##### 3.1.1. *Vrn-B1* térképezése

A térképezési populáció szüleinek átlagos virágzási ideje nem vernalizált körülmények között  $70,6 \pm 2,97$  nap volt a Chinese Spring és  $75,6 \pm 1,08$  nap a Chinese Spring (Cheyenne 5B) esetében. A rekombináns szubsztitúciós vonalak virágzási ideje a 66,4 naptól a 88,4 napig terjedő tartományba esett. Ez az adatsor transzgresszív szegregációt mutatott, mely két ellentétes hatású lókuszt jelenlétét valószínűsítette.

A szülők között 9 SSR marker mutatott polimorfizmust az 5B kromoszóma hosszú karján, melyeket leteszteltünk a térképezési populáció egyedein is. Az 5B kromoszóma hosszú karjának genetikai térképe 92 cM-t fedett le 12 cM átlagos távolsággal az egyes markerek között.

A marker regressziós és egyszerű intervallum térképezéses analízissel két, virágzási időt befolyásoló QTL elhelyezkedését sikerült meghatározunk. Az elsődleges QTL az 5B kromoszóma hosszú karján, disztálisan helyezkedett el, 78 cM-ra a centromérához térképezett SSR markerektől, szorosan kapcsolatosan az *Xgwm604* lókuszhhoz, és disztálisan az *Xgwm408* lókusztól. Ennek a QTL-nek az additív hatása 1,76 nap volt, és a fenotípusos variancia 10,7%-t magyarázta. A késői allél a Cheyenne 5B kromoszómája hordozta.

Röder és munkatársai (1998) kimutatták, hogy az *Xgwm604*, és az *Xgwm408* mikroszatellit lókusztok az 5-ös csoport kromoszómáin szorosan kapcsolatosak (9,7 cM, és 4,5 cM) az *Xcdo504-5B* RFLP lókuszhhoz. A homeológ *Xcdo504-5A* RFLP lókuszt az 5A kromoszóma hosszú karján szorosan kapcsolatos a *Vrn-A1* vernalizációs génnel (Galiba és mtsai. 1995). Figyelembe véve az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak hasonlóságát, ez az 5B kromoszómán talált QTL a *Vrn-B1* génnel felelhet meg.

##### 3.1.2. Koraisági lókusztok térképezése

A Chinese Spring/Cheyenne 5B populáción talált, virágzási időt befolyásoló, másodlagos szegregáló QTL kevésbé kifejezett, de szignifikáns hatásúnak mutatkozott. Az additív hatása 1,49 nap volt, és a fenotípusos variancia 8,2%-t magyarázta. Ez a QTL a centromérához közel, az *Xwmc73* SSR lókusztal kapcsolatosan helyezkedett el. Korábbi, árpan végzett térképezési kísérletekkel kimutatták egy koraisági (*Eps*) QTL jelenlétét homeológ pozícióban (Laurie és mtsai. 1995), ezért feltételeztük, hogy az általunk talált QTL is egy *Eps* lókuszt, és az *Eps-5BL* nevet adtuk neki. Ennek a hipotézisnek az alátámasztására, a Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó, teljesen vernalizált térképezési populáció virágzási idejét vizsgáltuk.

A két szülő átlagos virágzási ideje  $88,5 \pm 2,6$  nap volt a Hobbit, és  $86 \pm 3,7$  nap a Hobbit (Chinese Spring 5BL) esetében. A rekombináns szubsztitúciós



vonalak virágzási ideje a 77,6 naptól a 102,7 napig terjedő tartományba esett, tehát szintén transzgresszív szegregációt mutatott, legalább két ellentétes hatású lókuszt meglétét jelezve.

A szülők között 9 mikroszatellit, és 5 RFLP marker mutatott polimorfizmust, ezekkel teszteltük a Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) rekombináns vonalainkat. Az 5B kromoszóma hosszú karjának genetikai térképe 68 cM-t fedett le, a markerek közötti átlagos távolság 6,8 cM volt.

Bár a transzgresszív szegregáció arra utalt, hogy valószínűleg két ellentétes hatású lókuszt szegregál ebben a populációban, a QTL analízissel csak egyetlen, a virágzási időt befolyásoló, QTL jelenlétét sikerült kimutatni, amely a centromérához közel (kb. 16 cM), és az *Xgwm499* SSR lókuszhoz kapcsoltan helyezkedett el, és valószínűsíthető, hogy egy *Eps* lókusztól van szó. A QTL-nek az additív hatása 1,2 nap volt, és a fenotípusos variancia 5,7%-t magyarázta ebben a keresztezésben.

### 3.1.3. *Fr-B1* térképezése

A fagyasztási tesztet követően a szülők bonitálási értékei  $-11^{\circ}\text{C}$ -on 1,8 (Chinese Spring), és 2,8 (Chinese Spring(Cheyenne5B)) voltak, míg  $-12^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztást követően 0,5 (Chinese Spring), és 2,0 (Chinese Spring(Cheyenne5B)). A rekombináns szubsztitúciós vonalokhoz tartozó bonitálási értékek  $-11^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztást követően a 0,9-től 3,4-ig terjedő tartományba estek,  $-12^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztásnál pedig 0,05-től 3,0-ig. A QTL analízisnél a *Vrn-B1* térképezésénél használt térképet vettük figyelembe, kivéve négy hiányzó vonalat.

A térképezési adatok, és a bonitálási értékek felhasználásával, egy darab QTL-t találtunk 40 cM-ra a centromérához legközelebb eső markertől, és a QTL azonos pozícióban helyezkedett el mind a  $-11^{\circ}\text{C}$ -os, mind a  $-12^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztási adatok esetében. A QTL szorosan kapcsolt az *Xgwm639* SSR lókusssal, és additív hatása 0,53, ill. 0,33 volt  $-11^{\circ}\text{C}$  és  $-12^{\circ}\text{C}$ -on, és a fenotípusos variancia 31,4%-t magyarázta  $-11^{\circ}\text{C}$ -on, tehát jelentős a hatása.

## 3.2. PCR alapú markerek kifejlesztése fagyűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

A meglévő térképezési adatok gyakorlati felhasználásának az egyik módja lehet az egyes jellegekhez kapcsolt markerek alkalmazása az adott tulajdonságra történő szelekcióra. Ezekben a kísérleteinkben a gabonafélék 5-ös homeológ kromoszómáinak a fagyűrésért felelős régióira térképezett RFLP markerek PCR-alapú markerekké átalakítását, illetve egyéb – fagyűrő genotípusok szelekciójára használható – PCR alapú markerek árpában történő tesztelését és térképezését végeztük el.

### 3.2.1. Fenotipizálás

A genotípusok télállóság szerinti csoportosítása két éves szántóföldi kísérletek (Fiorenzuola, Észak-Olaszország) eredményein alapszik, melyeket 0-tól 9-ig terjedő bonitálási értékekkel jellemeztünk.

A fagyűrő genotípusok átlagos  $F_v/F_m$  értéke 0,62 volt, a legalacsonyabb érték 0,42, míg a legmagasabb 0,78 volt. A fagyérzékeny genotípusok esetében átlagos  $F_v/F_m$  értéknek 0,14-et határoztunk meg, a legalacsonyabb érték 0,02, míg a legmagasabb érték 0,32 volt. A két csoport átlagos  $F_v/F_m$  értékei között jelentős különbség mutatkozott.

### 3.2.2. STS markerek kifejlesztése és tesztelése

Az RFLP markerek szekvenciái alapján készült primereket először a Nure és Tremois fajtákon teszteltük, hogy használhatók-e polimorf STS markerekként. E két fajta fagyűrőse karakteresen eltért, ezenkívül a keresztezésükből egy dihaploid térképezési populáció is rendelkezésünkre állt, mely lehetőséget adott a polimorf markerek térképezésére. A 23 felhasznált primer pár közül 12 esetében kaptunk a várt méretnek megfelelő hosszúságú PCR terméket mind 55°C, mind 60°C-os annealing hőmérsékleten. Két esetben, a *wg644* RFLP próba 3' szekvenciájához tervezett, illetve a *psr637* próba 5' szekvenciájához tervezett primerek felhasználásával kaptunk annealing polimorfizmust.

A *psr637* RFLP próbához készült STS primerek felhasználásával kapott PCR termék várt mérete 282 bp volt. Ez a fragment tisztán kivethető volt a legtöbb fagyűrő árpa genotípusban, míg az érzékenyek nagy részében hiányzott. Az eredményeink azt mutatják, hogy a marker nem univerzális, mivel a vizsgált genotípusok esetében a PCR termék tisztán megvan egy fagyérzékeny fajtában, ezzel szemben hiányzik néhány toleránsban.

A *wg644* RFLP próba 3' szekvenciájához készült STS primerek felhasználásával kapott PCR termék várt mérete 215 bp volt, és a Nure, ill. Tremois fajták között annealing polimorfizmust mutatott. Ennek a primer párnak a felhasználásával más fragmentek is láthatók voltak a teszt gélen, melyek egy komplex mintázatbeli polimorfizmust mutattak a különböző fagyűrőse fajták között. A PCR termékek mintázata a fagyűrő genotípusok esetében egyszerűbb, mivel itt hiányzik a 215 bp-os annealing polimorfizmust mutató DNS sáv, míg egy 500 bp körüli fragment jelenléte figyelhető meg. A fagyérzékeny fajtáknál egy jóval komplexebb DNS mintázat van jelen különböző méretű sávokkal. Ez a marker sem univerzális, megfigyelhető néhány kivétel a fagyűrő, és a fagyérzékeny genotípusok között is.

### 3.2.3. Az *OPA17* RAPD marker tesztelése

Az *OPA17* RAPD marker polimorfizmust mutatott a Nure és a Tremois fajták között, és jó hatékonysággal segített megkülönböztetni a különböző fagyűrőse genotípusokat. A fagyérzékeny genotípusokban egy 650 bp körüli fragment figyelhető meg, míg a toleráns genotípusoknál egy erősebb 700 bp körüli,

és pár esetben egy gyengébb 750 bp körüli sáv van jelen. Hasonlóan a korábban említett STS markerekhez, az *OPA17* segítségével sem lehetett 100%-os biztonsággal elkülöníteni a fagyűrő genotípusokat a fagyérzékenyektől, mivel akadtak ellentétes marker alléleket hordozó genotípusok.

#### 3.2.4. A polimorf markerek térképezése

A *psr637* STS polimorfizmust térképeztük a Nure x Tremois árpa térképezési populáción. A térképünkön a *psr637* RFLP próbából készített STS markert az 5H kromoszóma hosszú karjára lokalizáltuk a *Vrn-H1* lókusztól proximálisan, 16,6 cM-ra.

A *wg644* RFLP próbából készült STS marker esetében a Nure x Tremois populáción két fragmentet sikerült térképezni. Az elsőt (~ 500 bp; *wg644c*) az 5H kromoszóma hosszú karjára, a centromérahöz közel térképeztük, a *Bmac0113* SSR markerrel szorosan kapcsoltn (1,2 cM), míg a másodikat ( 215 bp; *wg644b*) a 2H kromoszómára, a *Bmag0125* (12,4 cM) és az *Ebmac0415* (27,7 cM) SSR markerek közé.

Az *OPA17* RAPD próba esetében a Nure, ill. Tremois között polimorfizmust mutató fragmentek közül kettőt sikerült térképeznünk, az egyiket a 6H kromoszómára, míg a másikat az 5H kromoszóma hosszú karjára, az *Xpsr637*-től 7,1 cM távolságra.

### 3.3. Új tudományos eredmények

#### Virágzási időt és fagyűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

- a) Új genetikai térképet hoztunk létre a búza 5B kromoszóma hosszú karjáról a Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) és a Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó térképezési populáción.
- b) Az 5B kromoszóma hosszú karjának disztális részére, az *Xgwm604* SSR lókuszhoz kapcsoltn térképeztünk egy virágzási időt befolyásoló lókuszt a Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, amely valószínűleg a *Vrn-B1* vernalizációs igényért felelős lókusznak felel meg.
- c) Az 5B kromoszóma hosszú karján, a centromérához közel, az *Xwmc73* SSR lókuszhoz kapcsoltn térképeztünk egy virágzási időt befolyásoló lókuszt a Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, amely valószínűleg egy koraisági lókusznak (*Eps-5BL*) felel meg.
- d) A Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) térképezési populáción térképeztünk egy virágzási időt befolyásoló lókuszt az 5B kromoszóma hosszú karján az *Xgwm499* SSR lókuszhoz kapcsoltn.
- e) A Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, az 5B kromoszóma hosszú karján térképeztük az *Fr-B1* fagyűrésért felelős lókuszt, mely az *Xgwm639* SSR lókusszal kapcsoltn.

#### PCR alapú markerek kifejlesztése fagyűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

- f) A *wg644\_3* és a *psr637* RFLP próbákat átalakítottuk PCR-alapú STS próbákká.
- g) A *wg644\_3* és a *psr637* RFLP próbákból készült STS markerek, illetve az *OPA17* RAPD marker alkalmasak – bizonyos megszorításokkal - fagyűrő és fagyérzékeny árpa genotípusok szelekciójára az általunk vizsgált 28, különböző eredetű, árpa genotípuson történt tesztelesek alapján.
- h) A *psr637* STS markert és az *OPA17* RAPD markert az árpa 5H kromoszómájának hosszú karjára térképeztük, 7,1 cM távolságra egymástól.
- i) A *wg644\_3* STS markert a 2H kromoszómára térképeztük a *Bmag0125* (12,4 cM) és az *Ebmac0415* (27,7 cM) SSR markerek közé, ill. az 5H kromoszómán egy új pozícióba lokalizáltuk, a *Bmac0113* SSR markerrel szorosan kapcsoltn (1,2 cM).

## 4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

### 4.1. Virágzási időt és fagyűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

Kísérleteink során két térképezési populáció felhasználásával vernalizációs igényért felelős, koraisági és fagyűrési lokuszokat térképeztünk a búza 5B kromoszómájának hosszú karján. Az általunk elkészített térképek lefedik az 5B kromoszóma hosszú karját, és a markerek sorrendje megegyezik más populációkról korábban publikált adatokkal (Röder és mtsai. 1998).

Tesztelési adataink alapján térképeztünk mindkét populáción egy-egy koraisági lokuszt a centroméra közelében. Árpában már térképezték az 5H kromoszómán hasonló pozícióba koraisági lokuszt (Laurie és mtsai. 1995), és a kolinearitás miatt várható volt búzában is koraisági lokusz megléte az 5-ös kromoszómákon a centromérához közel. Ezenkívül Sarma és mtsai. (2000) fizikai térképezéssel két, virágzást befolyásoló, QTL-t azonosítottak az 5B kromoszómán, melyek közül az egyik a centromérához közel helyezkedett el. A két különböző populáción általunk térképezett *Eps* lokuszok pozíciói, adataink alapján különbözőek, de a kis távolság miatt valószínűleg ugyanarról a kis hatású koraisági lokuszról lehet szó.

Az 5B kromoszóma térképeinek összehasonlítása az 5A, ill. 5D kromoszómákéval bonyolult, mivel igen kevés közös marker található rajtuk, azonban a *Vrn* lokuszok hasonló elhelyezkedése a hosszú kar disztális részén egyértelműnek tűnik. A *Vrn-B1* ugyanis szorosan kapcsolódik az *Xgwm604* SSR markerrel. Bár ezt a markert nem térképezték az 5A kromoszómán (Galiba és mtsai. 1995), azonban az *Xcdo504* RFLP lokusz mind a *Vrn-A1*-gyel, mind az *Xgwm604*-gyel kapcsolódik. Továbbá, Sarma és mtsai. (2000) a búza 5-ös homeológ kromoszómáit vizsgálták abból a szempontból, hogy azok egyes régiói, milyen rizs kromoszómákkal mutatnak hasonlóságot. Közös RFLP markerek segítségével kimutatták, hogy a *Vrn* régió az 5A, ill. az 5B kromoszóma esetén is a rizs 3-as kromoszómájával mutat homeológiát.

Az *Fr* gének esetében az 5A, ill. az 5B kromoszómán elfoglalt pozíciójuk között nincs olyan nagy hasonlóság, mint a *Vrn* géneknél. Ismét a rizzsel történő összehasonlító térképezési adatok nyújtottak segítséget a magyarázathoz (Sarma és mtsai. 2000). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak hosszú karja (a centromérához közelebb eső része) nagyfokú hasonlóságot mutat a rizs 9-es kromoszómájával. A mi esetünkben az *Fr-B1* lokusz szorosan kapcsolódik volt az *Xgwm639* SSR lokusszal. Ez az SSR lokusz azonban kapcsoltságot mutatott az *Xpsr120* RFLP lokusszal a *Triticum turgidum* ssp. *durum*, Messapia x *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, MG4343 térképen (Korzun és mtsai. 1999). Ez az RFLP lokusz az 5B kromoszóma azon régiójában helyezkedik el, amely a rizs 9-es kromoszómával mutat hasonlóságot. A Chinese Spring-ből származó deléciós vonalak felhasználásával végzett kísérletekben Sutka és mtsai. (1999) kimutatták, hogy az *Fr-A1* az 5A kromoszómán szintén a rizs 9-es

kromoszómájával homeológ régió helyezkedik el, proximálisan a rizs 3-as kromoszómájával homeológ régiótól, ahol a *Vrn* gének találhatóak. Bár a *Vrn-B1* és az *Fr-B1* között, az 5B kromoszóma hosszú karján, nincs meg az a szoros kapcsoltság, mint a *Vrn-A1* és az *Fr-A1* között az 5A kromoszómán, azonban mindkét lókuszt homeoallélikusnak tűnik. A legújabb eredmények tükrében azonban nem zárható ki az a magyarázat sem, hogy az általunk térképezett *Fr-B1* lókuszt a Vágújfalvi és mtsai. (2003) által alakított térképezett *Fr-A2*-vel homeológ, mivel mindkét lókuszt a kromoszóma hosszú karjának középső részén helyezkedik el. A rendelkezésre álló adatok alapján tehát az *Fr-B1* homeológia viszonya nem tisztázható egyértelműen, ennek pontos megállapításához további vizsgálatok szükségesek.

Ezzel a munkával lehetővé válik a *Vrn* és *Fr* gének összehasonlító térképezése és további vizsgálata a búza 5-ös homeológ csoport kromoszómáin.

#### 4.1.1. A kapott adatok manuális kiértékelése: szintértépezés

A számítógépes elemzés segítségével kapott eredményeket célszerűnek tartottuk manuális adatelemzéssel is ellenőrizni, melyhez hasznos eszköz a szintértépezés (Kiss és mtsai. 1998).

Az 5B kromoszóma hosszú karjának kapcsoltsági térképét szintértépezéssel is meghatároztuk, és az így kapott eredmények megerősítették a számítógépes programmal végzett analízisünket.

A fenotípusos adatok elemzésekor a virágzási idő meghatározásánál mindkét populációban megvizsgáltuk a csak az egyik, illetve csak a másik szülői genotípust mutató vonalakat, és azt találtuk, hogy az egyforma szülői genotípusú vonalak fenotípusos értékei nagy különbségeket mutattak. Mivel a vonalaink csak az 5B kromoszómára rekombinánsak, a genom többi része egyforma, így ez a jelenség csak azzal magyarázható, hogy az általunk nem térképezett rövid karon egy, vagy több nagyobb hatású, virágzást befolyásoló lókuszt helyezkedhet el, mely az általunk térképezett kisebb hatású lókuszzal együtt felelős a kapott fenotípusos értékekért. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a fenotípusos értékekben jelentős transzgresszív szegregáció mutatkozott, míg az általunk térképezett QTL-ek csak a fenotípusos variancia kis százalékát magyarázták. Kísérleteink során a rendelkezésünkre álló konszenzus térkép adatait felhasználva számos markert teszteltünk populációnkon az 5B kromoszóma rövid kar genetikai térképének létrehozása céljából, de a tesztelt markerek nem adtak értékelhető terméket, vagy nem mutattak polimorfizmust. A rövid kar markerekkel történő telítése segítheti ennek a kérdésnek a tisztázását.

A szintértépezéssel nemcsak kapcsoltsági térképet tudunk létrehozni, hanem a  $-12^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztási kísérlet adatait felhasználva, a fagyűrési lókuszt pozícióját is meg tudtuk határozni. Ezt az tette lehetővé, hogy a térképezési populáció vonalainak fenotípusos eltérését csak egy lókuszt okozta, így a vonalak fenotípusos értékei többé-kevésbé lépcsős eloszlást mutattak. Az ugrásnál a vonalak fenotípusos értékei átalakíthatók voltak genotípusos értékekké, így a

fagyűrési tulajdonság kromoszómális elhelyezkedése, mint egylókuszos tulajdonság, egyszerű színtérképezéssel is meghatározhatóvá vált. Ennek a módszernek az az előnye, hogy a kapcsolt markerek és a fenotípus között a rekombinációk láthatóvá válnak, így a térképezésen alapuló klónozás is elvégezhető. A  $-11^{\circ}\text{C}$ -os fagyasztás, illetve a virágzási idő adatai nem mutattak ilyen lépcsős eloszlást, így azokat nem tudtuk a fenti módon térképezni.

#### **4.2. PCR alapú markerek kifejlesztése, tesztelése, és térképezése fagyűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán**

##### *4.2.1. STS markerek kifejlesztése RFLP markerekből*

Vizsgálataink során búzában és árpában a fagyűrésben kulcsszerepet játszó 5A, illetve 5H kromoszóma hosszú karjára térképezett RFLP markerekkel dolgoztunk, hogy azokat PCR-alapú markerekké alakítva lehetővé tegyük felhasználásukat fagyűrő árpa genotípusok gyors, egyszerű és olcsó szelektálására. Kísérleteinket 16 RFLP markerrel végeztük, és azok szekvenciái ismeretében 23 primer párt teszteltünk két, fagyűrésében karakterisztikusan eltérő, árpa genotípuson (Nure, illetve Tremois). A 23 primer párból 12 felhasználásával kaptunk várt hosszúságú terméket, melyek közül 2 (8,7%) mutatott annealing polimorfizmust. A polimorf STS markereket 28 különböző fagyűrésű árpa genotípuson teszteltük (15 fagyűrő, illetve 13 fagyérzékeny).

A *psr637* RFLP próbából készült STS marker felhasználásával jó hatékonysággal lehetett különbséget tenni a fagyűrő és a fagyérzékeny árpa genotípusok között. A *psr637* RFLP markert az *Fr-Vrn* régiótól proximálisan térképezték búzában (Galiba és mtsai 1995), a belőle készített STS markert hasonló pozícióba lokalizáltuk mi is, ami jelzi az eredeti RFLP marker és a belőle készült PCR marker hasonló genetikai viselkedését. A marker *Fr-Vrn* régiótól lévő távolsága azonban nem magyarázza a fagyűrő és fagyérzékeny genotípusok közötti eltérő mintázatot. Olasz partnerünkkel közösen szántóföldi télállósági kísérleteket, és növénynevelő kamrában végzett fagyasztási teszteléseket is végeztünk fagyűrési QTL-ek térképezése céljából a Nure x Tremois populáción (Francia és mtsai., publikálás alatt). Az itt kapott új adatok ismertetését szükségesnek tartjuk a kapott eredményeink könnyebb értelmezése és magyarázata miatt, azonban ezek az adatok nem tartoznak a disszertáció új tudományos eredményei közé. Az 5H kromoszómán a télállósági adatokkal végzett QTL analízist követően egy új fagyűrési QTL-t azonosítottunk a *psr637* STS markertől 7,6 cM-ra, míg a növénynevelő kamrában végzett fagyasztási teszt adataival végzett QTL analízis a *psr637*-től 9,9 cM távolságra adott szignifikáns QTL-t. Mivel az újonnan térképezett télállósági, illetve fagyűrési QTL kis távolságra helyezkedik el ettől a markertől, ez logikus magyarázatnak tűnik a különböző fagyűrésű genotípusok közötti eltérő mintázatra, és ez a távolság magyarázza az azonos fagyűrési jellegű genotípusok között meglévő kivételeket is, a marker és a fagyűrési tulajdonságért felelős lókusz közt esetlegesen fellépő rekombináció miatt.

A *wg644* RFLP próbából készült STS marker esetében nem ilyen egyszerű a helyzet. Az általunk térképezett polimorfizmusok közül a 2H kromoszómára térképezett lókuszt minden bizonnyal megegyezik a Salvo-Garrido és mtsai. (2001) által *Hordeum bulbosum*-ban térképezett *Xwg644* RFLP lókusssal. Azonban ez nem magyarázza az STS marker használatakor a fagyűrő és fagyérzékeny genotípusok közötti különbséget, mivel a 2H kromoszómán eddig nem térképeztek fagyűrési QTL-t. Az általunk térképezett másik polimorfizmust az 5H kromoszómára lokalizáltuk, azonban a nagy távolság miatt kizárt, hogy ez a lókuszt azonos legyen a korábban közölt *wg644* RFLP marker pozíciójával. Valószínűnek tartjuk, hogy a *wg644* markernek egy, eddig még nem közölt, új lókuszt azonosítottunk. Az a tény, hogy a *wg644* STS marker különböző mintázatokat mutatott a fagyűrő és fagyérzékeny genotípusokban, nehezen magyarázható, mivel az általunk végzett QTL analízis nem eredményezett fagyűrővel kapcsolatba hozható hatást az 5H kromoszómán ebben a régiójában, és korábbi irodalmi adatok sem utalnak arra, hogy az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak ebben a régiójában fagyűrési lókusztok lennének. Lehetségesnek tartjuk, hogy a korábban az *Fr-Vrn* régióba térképezett eredeti RFLP markernek megfelelő fragmentumok nem mutattak polimorfizmust a rendelkezésünkre álló térképezési populáció szülői között, így térképezni sem tudtuk, de a fagyérzékeny genotípusokban meglévő, nem térképezett, fragmentek valamelyikével azonosak lehetnek. Ennek hipotézisnek a bizonyítását a fragmentumok direkt szekvenálásával, illetve a fragmentek másik térképezési populáción történő szegregációs analízisével tervezzük elvégezni.

#### 4.2.2. Egyéb szelekcióra használható PCR-alapú markerek: *OPA17* RAPD marker

A RAPD marker 3 jól ismételtető polimorf fragmentumot adott. A szántóföldi kísérlet adataival, és a növénynevelő kamrában végzett fagyasztási kísérlet adataival elvégzett összetett intervallum térképezéssel két lókuszt találtunk az 5H kromoszóma hosszú karján amely kapcsolatba hozható a fagyűrővel. Ezek közül az egyik a *cbfl-OPA17a* intervallumra (4,1 cM) esett, és a fenotípusos variancia 46%-áért felelős 13,4-es LOD értékkel. A fagyűrőért felelős allélt a Nure hordozta. A fagyűrési és télállósági QTL-ek szoros kapcsoltságot mutattak az *OPA17*-tel, mivel 2,8 cM, illetve 0,5 cM távolságra helyezkedett el a QTL maximuma ettől a RAPD markertől.

A vizsgált markerek közül az *OPA17* tűnik a legígéretesebbnek, mivel az általunk térképezett fagyűrési QTL a *cbfl-OPA17a* intervallumra esett.

Árpában ez a munka az első, fagyűrő genotípusok szelektálására alkalmas PCR-alapú markerek kifejlesztésére. A három, általunk vizsgált marker, függetlenül a növekedési jellegtől, alkalmasnak tűnik a vizsgált genotípusokban az 5H kromoszómához kötött fagyűrési tulajdonság nyomon követésére, bár a vizsgált markerek további tesztelése egy nagyobb genotípus kollekción, illetve nemesítési vonalak bevonása a vizsgálatokba további értékes információkat



adhatnak a nemesítésben történő felhasználhatóságukról. A három polimorf marker közül egyik sem bizonyult univerzálisnak, egyes fagyűrő, és fagyérzékeny genotípusok egyaránt hordoztak ellentétes marker alléleket, azonban egy keresztezési programban a három marker együttes alkalmazása, illetve a legmegfelelőbb felhasználása segítséget nyújthat a kívánt fagyűrési tulajdonság szegregációjának nyomon követésére. A fagyűrés komplex, mennyiségi tulajdonság, és a toleranciát több gén együttes hatása okozza, az azonban bizonyított, hogy az 5H kromoszóma szerepe a fagyűrésben kulcsfontosságú (Hayes és mtsai. 1993), így az ide térképezett markerek alkalmasak lehetnek az 5H kromoszóma fagyűrésért felelős régióinak nyomon követésére.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Tóth B, Hayes PM, Skinner J, Pecchioni N (2003) Two loci on chromosome 5H(7) are responsible for frost tolerance in the 'winter' x 'spring' ('Nure' x 'Tremois') barley cross. *Theor Appl Genet*: Közlésre elfogadva
- Galiba G, Quarrie SA, Sutka J, Morgounov A, Snape JW (1995) RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theor Appl Genet* 90:1174-1179
- Hayes PM, Blaket T, Chen THH, Tragoonrung S, Chen S, Pan A, Liu B (1993) Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winter hardiness. *Genome* 36: 66-71.
- Kiss GB, Kereszt A, Kiss P, Endre G (1998) Colormapping: a non-mathematical procedure for genetic mapping. *Acta Biol Hung* 49:47-64
- Korzun V, Röder MS, Wendehake K, Pasqualone A, Lotti C, Ganai MW, Blanco A (1999) Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid bread wheat into a genetic linkage map of durum wheat. *Theor Appl Genet* 98:1202-1207
- Laurie DA, Pratchett N, Bezant J, Snape JW (1995) RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome* 38:575-585
- Rizza F, Pagani D, Stanca AM, Cattivelli L (2001) Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. *Plant Breeding*. 10:389-396
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganai MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023
- Salvo-Garrido H, Laurie DA, Jaffe B, Snape JW (2001) An RFLP map of diploid *Hordeum bulbosum* L. and comparison with maps of barley (*H. vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theor Appl Genet* 103: 869-880
- Sarma RN, Fish L, Gill BS, Snape JW (2000) Physical characterization of the homoeologous group 5 chromosomes of wheat in terms of rice linkage blocks, and physical mapping of some important genes. *Genome* 43:191-198
- Sutka J (1981) Genetic studies of frost resistance in wheat. *Theor Appl Genet* 59:145-152
- Sutka J, Galiba G, Vágújfalvi A, Gill B S, Snape J W (1999) Physical mapping of the *Vrn-A1* and *Fr1* genes on chromosome 5A using deletion lines. *Theor Appl Genet* 99 : 199-202
- Vágújfalvi A, Galiba G, Cattivelli L, Dubcovsky J (2003) The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. *Mol Genet Genomics* 269(1): 60-67

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Cikkek referált folyóiratban:

Erdei L, Szegletes Zs, Barabás NK, Pestenác A, Fülöp K, Kalmár L, Kovács A, **Tóth B**, Dér A (1998) Environmental stress and the biological clock in plants: changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *J. Plant Physiol.* 152:265-271

Balla A, **Tóth B**, Timár Gy, Bak J, Krajcsi P (2001) Molecular targets for pharmacological cytoprotection. *Biochemical Pharmacology.* 61: 769-777

Kocsy G, **Tóth B**, Berzy T, Szalai G, Jednákovits A, Galiba G (2001) Glutathione reductase activity and chilling tolerance are induced by a hydroxylamine derivative BRX 156 in maize and soybean. *Plant Science.* 160: 943-950

**Tóth B**, Galiba G, Fehér E, Sutka J, Snape JW (2003) Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat. *Theor Appl Genet* (közlésre elfogadva, DOI 10.1007/s00122-003-1275-3)

Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, **Tóth B**, Hayes PM, Skinner J, Pecchioni N (2003) Two loci on chromosome 5H(7) are responsible for frost tolerance in the 'winter' x 'spring' ('Nure' x 'Tremois') barley cross. *Theor Appl Genet* (közlésre elfogadva)

**Tóth B**, Francia E, Rizza F, Stanca AM, Galiba G, Pecchioni N (2003) Development of PCR-based markers of chromosome 5H for assisted selection of frost tolerant genotypes in barley. Publikálás alatt.

### Előadások, poszterek:

Erdei L, Szegletes Zs, Barabás NK, Pestenác A, Kovács A, **Tóth B** (1996) Effect of environmental stress factors on the circadian rhythm in wheat. *Plant Physiol.Biochem. Special Issue*, p. 267

Erdei L, Szegletes Zs, Barabás NK, Pestenác A, Fülöp K, Kalmár L, Kovács A, **Tóth B** (1997) Environmental stresses and the circadian rhythm in plants. Proceedings of the Congress "Stress of Life". Budapest, Hungary, July 1-5, 1997, 100.

Galiba G, **Tóth B**, Kerepesi I, Vágújfalvi A, Kocsy G, Fehér E, Sutka J. (2002) Mapping of genes involved in abiotic stress resistance in wheat. Chinese-

Hungarian workshop on “Molecular genetics and breeding in wheat” Lecture Abstracts, 21-26 May, 2002. Martonvásár, Szeged. p.: 24-25.

Galiba G, Kocsy G, Kerepesi I, **Tóth B**, Vágújfalvi A, Cattivelli L, Snape JW, Dubcovsky J, Gill BS, Sutka J. (2002) Genetic and physical mapping of genes regulating cold hardiness in wheat. 6th Gatersleben research Conference „Plant Genetic Resources in the Genomic Era: genetic Diversity, Genome Evolution and New Applications”. March 7-11, 2002 IPK Gatersleben, Proceedings p.: 63

Galiba G, **Tóth B**, Kerepesi I, Vágújfalvi A, Fehér E, Snape JW, Sutka J. (2002) Genetic and cytologically based physical mapping of traits affecting cold hardiness in wheat. The 12th International EWAC Workshop 1-6 July 2002, John Innes Centre, Norwich, Abstracts p16.

**Tóth B**, Francia E, Galiba G, Rizza R, Stanca AM, Sutka J, Pecchioni N, Snape JW (2002) Mapping genes affecting flowering time and frost tolerance on chromosome 5B of wheat and development of STS markers from RFLP markers on chromosome 5H of barley In: EUCARPIA Cereal Section Meeting 21-25 November, 2002, Italy. (Eds Stanca AM, Faccioli P), p. 113

**Tóth B**, Francia E, Pecchioni N, Snape JW, Sutka J, Galiba G (2003) PCR-alapú markerek létrehozása az árpa fagyállóságának tesztelésére. IX. Növénynevelési Tudományos Napok, 2003. március 5-6., p. 34

**Tóth B**, Galiba G, Sutka J, Snape JW (2003) Fagytűrési és virágzást befolyásoló gének térképezése búza 5B kromoszómán. V. Magyar Genetikai Kongresszus, 2003. április 13-15, Siófok, p. 84

Galiba G, **Tóth B**, Vágújfalvi A, Dubcovsky J, Cattivelli L, Snape JW, Pecchioni N, Sutka J (2003) Fagyállóságot befolyásoló gének térképezése és hidegindukálható gének regulációja gabonafélékben. V. Magyar Genetikai Kongresszus, 2003. április 13-15, Siófok, p. 44