

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**PCR alapú molekuláris markerek azonosítása és felhasználása
a búza levélrozsa rezisztenciára való nemesítésben**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Tremmelné Tar Melinda

Gödöllő

2012.

Doktori iskola: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

Vezetője: Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja
egyetemi tanár,
SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet

Témavezető: Dr. Purnhauser László
tudományos főmunkatárs,
mezőgazdasági tudományok kandidátusa
Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged

.....
Dr. Heszky László
iskolavezető

.....
Dr. Purnhauser László
témavezető

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

Magyarországon az őszi búza egyik legveszélyesebb betegsége a levélrozsdá ((*Puccinia recondita* Rob. ex Desmaz. f. sp. *tritici* /Erikss./, syn.: *Puccinia triticina* Eriks.), amely a fajták fogékonyságától, valamint a környezeti tényezőktől függően akár 50 % feletti termésvesztést is okozhat. Bár jelenleg több mint hatvan búza levélrozsdá rezisztencia (*Lr*) gén ismert, a köztermesztésben lévő fajtákban mindössze töredékük fordul elő. A folyamatos nemesítői munka részeként, a fajták genetikai variabilitásának növelése érdekében elengedhetetlen minél többféle rezisztencia gén beépítése a fajtákba valamint újabb rezisztencia források felkutatása.

Egy vagy több rezisztencia gén egy búzafajtába való beépítésének hagyományos módja idő és munkaigényes folyamat. Az utóbbi években elterjedt molekuláris marker technikák alkalmazásával ez jelentősen egyszerűsíthető és lerövidíthető. A molekuláris markerek gyakorlati alkalmazásának fontos területe a markerekre alapozott szelekció (MAS) és a búzafajták és nemesítési alapanyagok genetikai jellemzése. A gyakorlati alkalmazás szempontjából fontos, hogy a molekuláris marker az adott rezisztencia génnel szoros kapcsoltságban öröklődjön, megbízhatóan és rutinszerűen alkalmazható valamint a heterozigóta és homozigóta egyedek elkülönítése végett kodomináns legyen. Bár számos *Lr* génhez kapcsolt molekuláris markert ismerünk, nagy részük azonban nem kodomináns öröklődésű illetve a rezisztenciagénnel nem elég szorosan kapcsolt; mindezért továbbra is szükség van újabb, az *Lr* génekkel minél szorosabb kapcsoltságban öröklődő markerek azonosítására.

A dolgozat két kutatási téma eredményeit foglalja össze. Az első rész közepesen hatékony *Lr* génekkel (*Lr20* és *Lr52*) kapcsoltan öröklődő molekuláris markerek azonosítását és genetikai térképezését mutatja be. A második részben az említett *Lr* génekhez valamint az *Lr34* génhez szorosan kapcsolt molekuláris

markerek diagnosztikus és nemesítési célú gyakorlati alkalmazásának eredményeit foglalja össze.

Az egyes témák célkitűzései a következők voltak:

1. Az *Lr20* és *Lr52* levélrozsda rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek azonosítása, jellemzése és genetikai térképezése.
2. az *Lr20* gén már ismert, szorosan kapcsolt STS markerének (*Xsts638*) validálása és alkalmazása visszakeresztezéses nemesítési programban a markerre alapozott szelekció segítségével
3. Az *Lr20*, *Lr52* és *Lr34* gének azonosítása ismert és általunk azonosított molekuláris markerek felhasználásával, valamint az említett gének gyakoriságának vizsgálata a Magyarországon 1970 és 2005 között elismert őszi búza fajtákban, továbbá az *Lr34* gén hatékonyságának elemzése több éves megfigyelésen alapuló természetes szántóföldi levélrozsda fertőzöttségi adatok segítségével.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Növényi anyag

Molekuláris markerek azonosítására az *Lr20* gént hordozó RL6092 (Thatcher*6/Timmo) (rövidítve: NIL *Lr20*), az *Lr52* gént hordozó RL6107 (Thatcher*6/V336), (rövidítve: NIL *Lr52*) NIL-eket, valamint a Thatcher és a GK Délibáb fogékony fajtákat használtuk. A molekuláris markerek és a rezisztencia gének kapcsoltóságának vizsgálatához és a genetikai térképezéshez a NIL *Lr20*/GK Délibáb valamint a NIL *Lr52*/GK Délibáb keresztezésből 119 illetve 267 F₂ egyedből álló populációt hoztunk létre. Az *Lr20*, *Lr52* és *Lr34* rezisztencia gén jelenlétét 1970-2005 között Magyarországon államilag elismert 222 őszi búza fajtában, valamint a hazánkban 1960-ban elismert Bezosztaja 1 orosz fajtában vizsgáltuk.

2.2 Az F₂ populációk növényeinek inokulációja és fenotípusos vizsgálata

Az F₂ populációkban az *Lr20* és *Lr52* gén jellemzésére alkalmazott 02000-04722700 patotípusba sorolt monospórás levélrozsa izolátumot Csősz Lászlóné (Gabonakutató Kft.) állította elő és bocsátotta rendelkezésemre. Az F₂ populációk egyedeit és a kontroll növényeket (NIL *Lr20*, NIL *Lr52*, GK Délibáb, Thatcher) 7 napos csíranövény korban inokuláltuk Csősz (2007) módszere alapján az előbbieken leírt levélrozsa razzsal. Az értékelést az inokulációtól számított 10. napon végeztük el a fertőzésre adott reakció alapján 0-4 skála (Stakman és mtsai 1962) segítségével. A rezisztencia típusok (IT) közül az F₂ populációk jellemzésekor az IT kisebb vagy egyenlő 2 rezisztensnek az IT 3 és 4 típusokat fogékonyak értékeltük.

2.3 DNS izolálás

A molekuláris markerek azonosításához felhasznált növényi anyag DNS izolálását Rogers and Bendich (1985) általunk módosított CTAB módszerével végeztük. A

222 fajta és a Bezosztaja 1 DNS mintáinak izolálása Purnhauser és mtsai (2011) módszere alapján történt.

2.4 A kísérletekben alkalmazott molekuláris technikák

Az *Lr20* és *Lr52* génhez kapcsolt markerek azonosítását AFLP (Vos és mtsai 1995), RGAP (Chen és mtsai 1998), RAPD (Tar és mtsai 2008), STS (Neu és mtsai 2002 és Obert és mtsai 2005) valamint SSR (Tar és mtsai 2008) módszerekkel végeztük. Az *Lr20* génnel kapcsolatos öröklődő markerek azonosítására 82 db AFLP, 48 db RGAP, 48 db SSR primerpárt és 1 db STS primert teszteltünk. Az *Lr52* génnel kapcsolatos öröklődő markerek azonosítására 280 db RAPD, 8 db STS és 48 db SSR primert vizsgáltunk.

A hazánkban államilag elismert 222 búzafajta genetikai jellemzésére az *Lr20* gént az *Xsts638* nevű STS (Neu és mtsai 2002) és az általunk azonosított *Xgwm344*, *Xwmc809* és *Xwmc274* SSR markerekkel, az *Lr52* rezisztencia gént az általunk azonosított *Xgwm234* SSR, illetve az *Xtxw200* STS markerrel, az *Lr34*-et pedig az *XcsLV34* (Lagudah és mtsai 2006) STS markerrel azonosítottuk.

2.9 Genetikai térképezés és statisztikai számítások

A molekuláris markerek kapcsoltsági analízisét és genetikai térképezését az *Lr20* és az *Lr52* gén esetében is a MAPMAKER 3.0 számítógépes programmal végeztük el (Lander és mtsai 1987). A kapcsoltság mértékének kiszámításához a Kosambi térképezési függvényt alkalmaztuk (Kosambi 1944).

A fajták levélrozda rezisztencia adatait a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (MgSzH) évente megjelenő kiadványaiból gyűjtöttük. Az *Lr34* gént hordozó és nem hordozó fajták rezisztencia adatainak elemzését az évenkénti átlaghoz viszonyítva t-próbával végeztük (Sváb 1981).

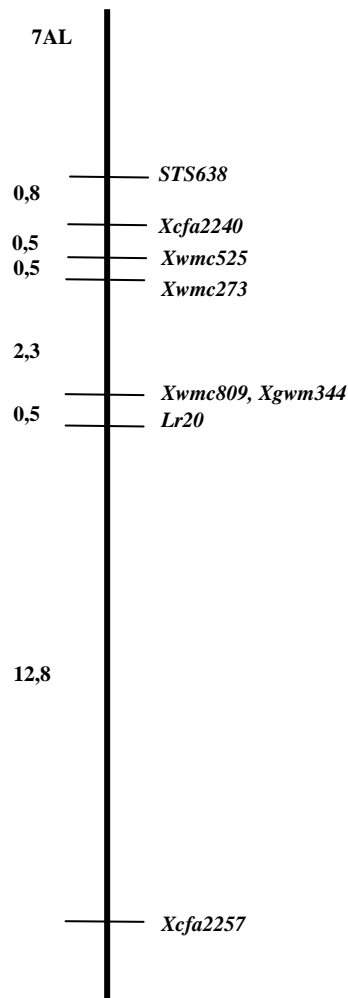
3. EREDMÉNYEK

3.1 Az *Lr20* génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása és jellemzése

Az *Lr20* génnel szorosan kapcsolt új molekuláris markerek azonosítására először elvégeztük a NIL *Lr20*/GK Délibáb F₂ populáció (119 egyed) fenotipizálását mesterséges inokulálással (rezisztens, szenzitív egyedek aránya 2 :1 volt).

Kapcsolt markerek azonosításához először 82 db Pst/Mse AFLP és a 48 db RGAP primerkombinációt teszteltünk, számos polimorf fragmentumot (markerjelöltet) azonosítottunk, azonban a kapcsoltsági analízis elvégzése (fenotípusos és markeres adatok egybevetése) után nem találtunk az *Lr20* génhez kapcsolt markert. Neu és mtsai (2002) által leírt, az *Lr20* rezisztencia génre specifikus *Xsts638* markert viszont sikeresen alkalmaztuk az általunk előállított F₂ populáció jellemzésére és 4,6 cM távolságra térképeztük a rezisztencia géntől (1. ábra).

A 48 db, a búza 7AL kromoszómájára specifikus SSR primer vizsgálata során 6 primer amplifikált polimorf fragmentumot. A kapcsoltsági analízis igazolta, hogy a hat SSR marker mindegyike kapcsolt az *Lr20* génhez. A markerek és a rezisztencia gén közötti térképtávolságot 0,5-12,8 cM között határoztuk meg. A markerek közül az *Xwmc809* és *Xgwm344* repulzív fázisban voltak jelen, tehát a polimorf fragmentum csak a fogékony egyedekben és a heterozigóta egyedekben volt azonosítható. A rezisztencia gén proximális oldalára öt SSR marker térképeződött, amelyek sorrendben a következők: *Xwmc809* (0,5 cM), *Xgwm344* (0,5 cM), *Xwmc273* (2,8 cM), *Xwmc525* (3,3 cM), *Xcfa2240* (3,8 cM). A rezisztencia gén disztális oldalára egyetlen SSR marker, az *Xcfa2257* (12,8 cM) térképeződött (1. ábra).



1. ábra: Az *Lr20* génhez kapcsolt SSR és STS markerek genetikai térképe. Jobb oldalon a markerek neve, baloldalon a genetikai távolság cM-ban olvasható.

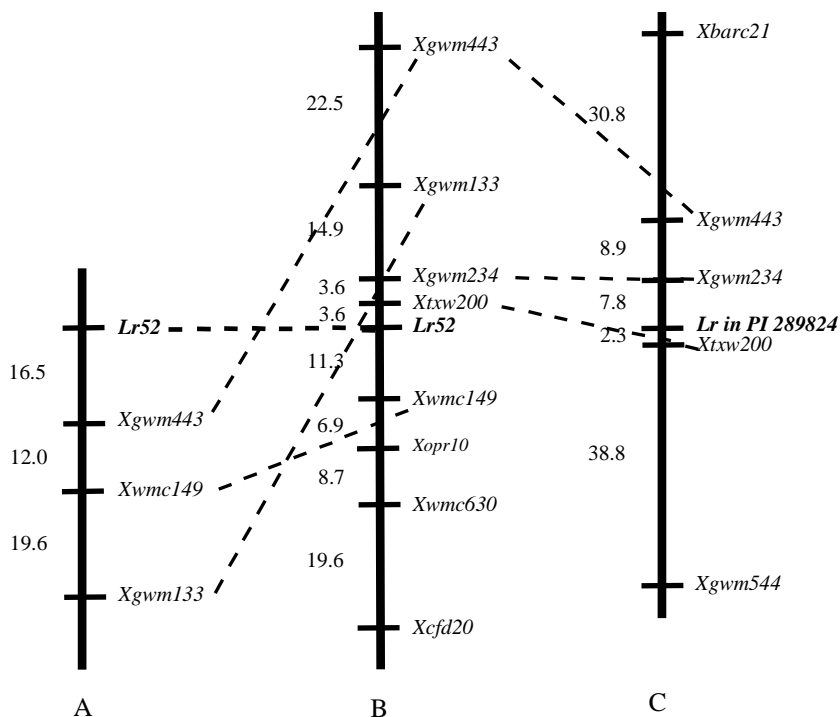
3.2 Az *Lr52* génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása és jellemzése

A NIL*Lr52/GK* Délibáb F_2 populáció (267 egyed) fenotipizálása során 188 rezisztens és 79 fogékony növény azonosítottunk (a monogénes 3:1 hasadási arány statisztikailag igazolt). Kapcsolt markerek azonosításához először 280 db RAPD primerrel teszteltük. A vizsgált primerek közül 11 (OPR-10, OPR-11, OPR-16, OPV-2, OPV-4, OPV-14, OPW-19, OPX-9, OPX-12, OPY-4, OPY-9) amplifikált polimorf fragmentumot. Közülük azonban csak az OPR-10 primerrel amplifikált

535 bp hosszú fragmentum mutatott kapcsoltságot a célgénnel, amit 18,2 cM távolságra térképeztünk a rezisztencia gén proximális oldalára (2. ábra).

Az 5BS kromoszómára specifikus STS primereket (8 db) is kipróbáltunk. Közülük csak a *Xtxw200* mutatott polimorf mintázatot a NIL *Lr52*, a Thatcher és a GK Délibáb között. E markert az általunk használt populációban 3,6 cM távolságra térképeztük az *Lr52* rezisztencia géntől disztális irányban (2. ábra).

A 44 db, az 5B kromoszóma rövid karjára specifikus SSR primer közül a rezisztens szülő, a Thatcher és a Délibáb között csupán 6 bizonyult polimorfnak. További tesztek során érdekes módon midegyikük kapcsoltságot mutatott az *Lr52* rezisztencia génnel — 7,2 - 46,5 cM távolságra térképeződtek a célgéntől (2. ábra). Az *Lr52* disztális oldalán a legközelebbi SSR marker az *Xgwm234* (7,2 cM), a proximális oldalán pedig az *Xwmc149* (11,3 cM távol). Mivel az általunk azonosított SSR markerek kodominánsak, ezért mind a homozigóta mind a heterozigóta egyedek elkülönítésére alkalmasak.



Hiebert és mtsai (2005) Tar és mtsai (2008) Obert és mtsai (2005)

2. ábra: Az *Lr52* rezisztencia génhez kapcsolt molekuláris markerek az 5B kromoszóma rövid karján.

3.3 Molekuláris markerek gyakorlati alkalmazása

3.3.1 Markerre alapozott szelekció

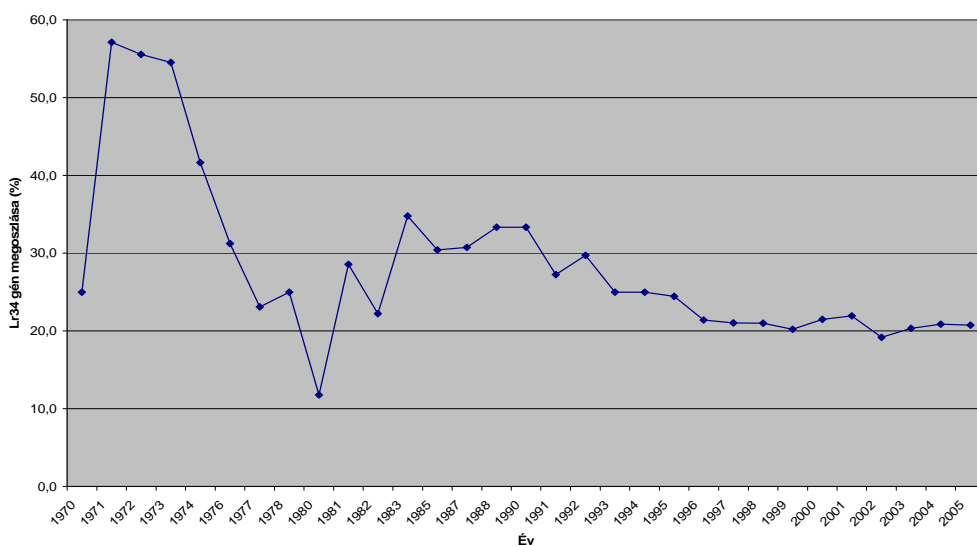
Markerre alapozott szelekcióval támogatott nemesítési programot indítottunk az *Lr20* gén beépítésére a Jubilejnaja-50 (levélrozsa fogékony) fajtába. Donorként a NIL *Lr20* vonalat választottuk. A markerre alapozott szelekcióhoz az STS638 primert használtuk — Neu és mtsai (2002) alapján ez szorosan (0,4 cM) kapcsolt az *Lr20* génnel. Az F₂ egyedeken elvégeztük a rezisztencia gén kimutatását a molekuláris markerrel, és azokkal az egyedekkel, amelyek hordozták a markert, valamint a Jubilejnaja-50 fajttal visszakeresztezést végeztünk. Az *Lr20* gén jelenlétét minden BC generációban vizsgáltuk az STS638 primer segítségével. A második visszakeresztezés után a törzseket szántóföldön vetettük el, és értékeltük a természetes levélrozsa fertőzés utáni rezisztenciájukat. A törzsek között levélrozsa ellenállóságbeli különbséget találtunk. Jelenleg a rezisztens törzsek szántóföldi kísérleteinkben szerepelnek.

3.3.2 *Lr* gének azonosítása búzafajtákban molekuláris markerek segítségével

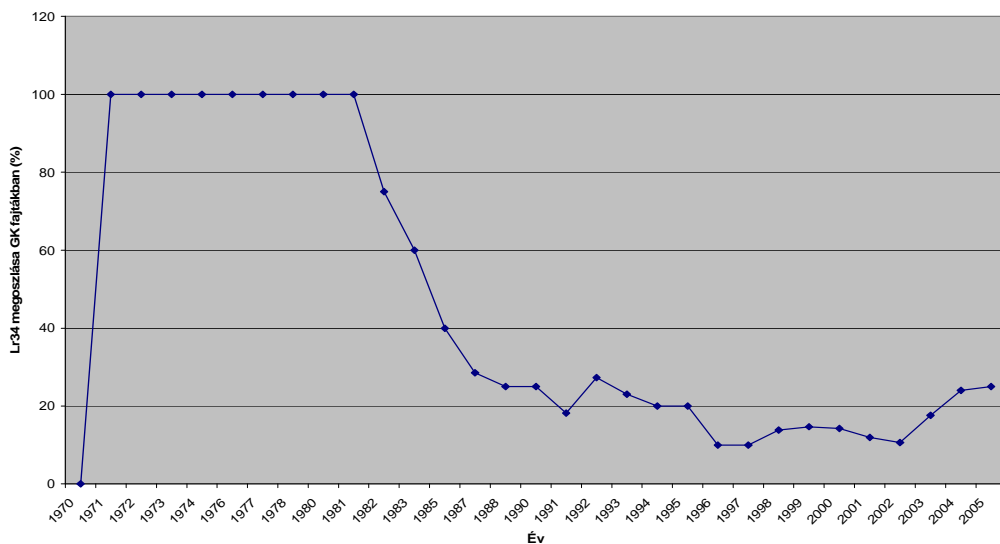
Az *Lr34* gént a Magyarországon 1970-2005 között regisztrált őszi búza fajták (n=222) közül 51-ben (23,0 %) valamint az 1960-ban elismert Bezosztaja 1-ben sikerült kimutatni az *XcsLV34* marker (Lagudah és mtsai 2006) segítségével. Összehasonlítva a két legnagyobb magyar nemesítőház három évtizedes programját az *Lr34* gén közel azonos gyakorisággal fordul elő: a szegedi fajták 23,9 %-ában (n=71), a martonvásári fajták 20 %-ában (n=70). Az egyéb magyar nemesítésű fajták 31,3 %-a, a hazánkban regisztrált európai fajták 23,1 %-a hordozza a rezisztencia gént.

Az *Lr34* gén gyakorisága jobban tanulmányozható, ha azt évenkénti megoszlásban vizsgáljuk az összes, az adott évben érvényes állami elismeréssel rendelkező búzafajtaéhoz viszonyítva. Az *Lr34* gén megoszlása a 222 vizsgált búzafajtában 11,8 % (1980) és 57,1 % (1971) között változott. A vizsgált fajták közül, az *Lr34* először az 1960-ban elismert orosz Bezosztaja 1 fajtában jelent meg.

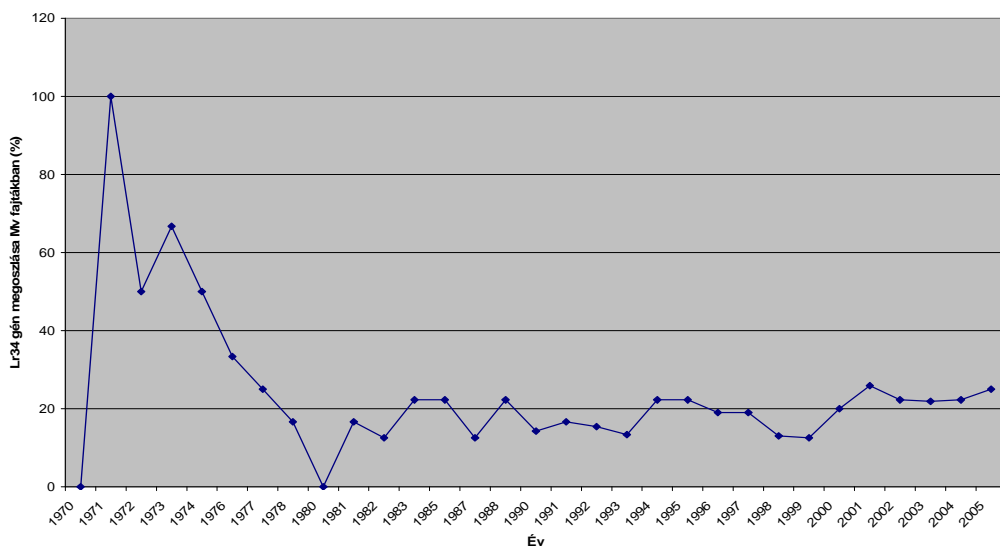
Az általunk részletesen vizsgált időszak (1970-2005) fajtái közül pedig a szintén orosz eredetű Kavkaz (állami elismerés 1970-ben) tartalmazta elsőként. A 70-es években további *Lr34*-s fajták jelentek meg: 4 db szegedi: GK 3, GK F2 (1971), GK Tiszatáj (1977) és GK Szeged (1978), 2 db martonvásári: Martonvásári 1 (1971) és Martonvásári 3 (1973), valamint egy bolgár: Burgas-2 (1972). Az *Lr34* gén előfordulása az 1971-1974-ig tartó időszakban volt a legmagasabb az adott évben állami elismeréssel rendelkező fajtákban (41,7-57,1 %). Arányuk 1980-ra étmenetileg lecsökkent, majd 1983 és 1990 között újra megnőtt (33,3-34,8 %). Az *Lr34* gén gyakoriságában, 1992-től kezdődően az ezredfordulóig folyamatos csökkenés figyelhető meg (3. ábra). Meg kell jegyezni, hogy a gént hordozó fajták arányának csökkenése ellenére az *Lr34* fajták száma általában növekszik, mivel az adott évben állami elismeréssel rendelkező fajták száma a megfigyelési időszak kezdete és vége között megtízszereződött. A 2005. évi adatokat értékelve megállapíthatjuk, hogy az akkor köztermesztésben lévő államilag elismert fajták (n=105) közül a szegedi és a martonvásári fajták hordozzák a legnagyobb százalékban (25-25 %) az *Lr34* gént (4-5. ábra).



3. ábra: Az *Lr34* gén megoszlása az 1970-2005 között az adott évben állami elismeréssel rendelkező búzafajtákban



4. ábra: Az *Lr34* gén megoszlása az 1970-2005 között, az adott évben állami elismeréssel rendelkező GK búzafajtákban



5. ábra: Az *Lr34* gén megoszlása az 1970-2005 között, az adott évben állami elismeréssel rendelkező martonvásári búzafajtákban

A természetes levélrozsda fertőzöttségi adatok a vizsgált fajták 72,1 %-ánál volt hozzáférhető 1985 és 2003. között. A természetes levélrozsda fertőzési adatokat évenként külön-külön értékeltük (9 év adatait használtuk). Kiszámoltuk az adott év

fertőzési átlagát, illetve megnéztük a legerősebben fertőződött fajta értékét (fertőzési maximum). Ez utóbbit az értékeléskor 100 %-nak véve négy fertőzési csoportot alakítottunk ki: rezisztensnek vettük azokat a fajtákat, amelyek a fertőzési maximumhoz viszonyítva 0-25 % fertőzést mutattak, mérsékelten rezisztensnek, amelyek 25,1-50 %, mérsékelten fogékonyak az 50,1-75 % és fogékonyak a 75,1-100 % fertőzést mutató fajtákat. A t-próba alapján négy év adatai szerint (1985, 1988, 1997 és 2002) szignifikáns különbség tapasztalható az *Lr34* gént hordozó és nem hordozó fajták fertőzöttségi százalékanak átlaga között.

Molekuláris markerek segítségével az *Lr20* gént a Partizánka, az Mv Szigma és a Boszanova fajtákban azonosítottuk, amely a 222 vizsgált fajtához viszonyítva 1,3 %-os gyakoriságot jelent. A 3 búzafajtában az *Lr20* gén mind a 4 markerrel (*Xsts638*, *Xwmc273*, *Xwmc809* és *Xgwm344*) elkülöníthető volt. Az *Lr52* gént szintén három fajtában (GK Olt, GK Szálka, Dunai) azonosítottuk az *Xgwm234* SSR és *Xtxw200* STS markerek segítségével. A GK Olt szegedi fajtában az *Lr52* gén mellett az *Lr34* gén markerét is kimutattuk.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1 Az *Lr20* gén molekuláris markerzési eredményeinek értékelése, következtetések

Munkánkban 6 db új, az *Lr20* génnel szorosan kapcsolt SSR markert azonosítottunk. Bár az SSR markerek általában kodomináns módon öröklődnek, munkánkban érdekes módon két olyan SSR markert (*Xwmc809* és *Xgwm344*) is azonosítottunk, amelyek dominánsan, ráadásul repulzióként öröklődtek, azonban e két marker mutatta legszorosabb kapcsoltságot (0,5 cM) az *Lr20* génhez. Bár a két első tulajdonság nemesítési szempontból bizonyos hátrányt jelent, adataink alapján eddig mégis ez a két marker öröklődik a legszorosabban az *Lr20* génhez. Az általunk térképezett 6 db SSR markerből 3 db (*Xwmc273* 2,8 cM, *Xwmc525* 3,3 cM és *Xcfa2240* 3,8 cM) 10 cM-on belül térképeződött és kodomináns öröklődést mutatott, így ezek könnyebben használhatók a MAS során, ugyanakkor a rezisztenciagéntől való távolságuk sem túl nagy a hatékony szelekciós munkához. A Neu és mtsai (2002) által diagnosztikus STS markerként leírt *Xsts638*-at szintén bevontuk vizsgálatainkba. Megfigyeléseink alapján a NIL*Lr20* (rezisztens) és GK Délibáb (fogékony) fajta keresztezésével előállított F2 térképezési populációban azonban ez a marker távolabbra térképeződött, mint Neu és mtsai (2002) vizsgálataiban (4,9 cM szemben a 0,4 cM-nal). Eredményeink alátámasztják Khan és mtsai (2005) által közölt adatokat, akik az *Lr20* és az *Xsts638* genetikai távolságát szintén nagyobbban (7,1 cM) mérték. Neu és mtsai (2002) az említett STS markeren kívül számos, a rezisztencia génnel együtt öröklődő RFLP és két SSR markert is azonosítottak. Ez utóbbiak (*Xgwm282* és *Xgwm332*) azonban túl nagy távolságra (32,8 cM) térképeződtek a rezisztencia géntől. Az általunk azonosított 6 db SSR marker közül 5 db (*Xcfa2240*, *Xgwm344*, *Xwmc273*, *Xwmc525* és *Xwmc809*) még az *Xsts638* markernél is szorosabb kapcsoltságot (4,9 cM) mutatott.

Neu és mtsai (2002) 12 olyan markert azonosított, amelyek az *Lr20* rezisztencia génnel kapcsolatosan öröklődtek, azonban e markerek közül egy sem akadt, amely a rezisztencia gén disztális oldalán helyezkedett volna el. Munkánkban azonban sikerült azonosítani egy SSR markert (*Xcfa2257*) 12,8 cM távolságra a rezisztencia gén disztális oldalán.

4.2 Az *Lr52* gén molekuláris markerezésének értékelése, következtetések

Munkánkban 6 db SSR (*Xcfd20*, *Xgwm133*, *Xgwm234*, *Xgwm443*, *Xwmc149* és *Xwmc630*), és 1 db STS (*Xtxw200*) és 1 RAPD (*Xopr10*) kapcsolt markert térképeztünk az *Lr52* génhez. Az SSR markerek közül az *Xgwm234* 7,2 cM távolságra térképeződött a rezisztencia géntől, így a MAS-ra jól használható. Hiebert és mtsai (2005) mikroszatelit markerek segítségével azonosították az *Lr52* gén helyét a genomban. Vizsgálatainkban az *Xgwm133*-at 48,1 cM-ra, az *Xwmc149*-et 28,5 cM-ra és az *Xgwm344*-et 16,5 cM-ra térképezték a rezisztencia géntől. Munkájukban a rezisztencia génhez legközelebbre térképezett SSR marker tehát az *Xgwm344* volt, mely a rezisztencia gén proximális oldalán helyezkedett el ellentétben a mi vizsgálatainkkal. Továbbá vizsgálataink során azt találtuk, hogy térképezési populációnkban az *Xwmc149* marker sokkal közelebb térképeződik az *Lr52* rezisztencia génhez, mint Hiebert és mtsai (2005) munkájában (11,3 cM szemben a 28,5 cM-nal). Eredményeink alapján az *Xwmc149* SSR marker is alkalmas a markerre alapozott szelekcióra.

Obert és mtsai (2005) egy iráni fajtában (PI289824) új *Lr* gént azonosítottak. Somers és mtsai (2004) a búza 42 kromoszómájára térképezett SSR markerek segítségével az 5BS kromoszómára lokalizálták ezt a gént, és így lehetségesnek tartották, hogy azonos az *Lr52* génnel. Munkájukban az új rezisztencia génnel a következő SSR markerek mutattak kapcsoltságot: *Xbarc21*-5BS (47,4 cM), az *Xgwm443*-5BS (16,7 cM), az *Xgwm234*-5BS (7,8 cM) és az *Xgwm544*-5BS (41,1 cM). Eredményeinkhez hasonlóan Obert és mtsai (2005) is az új rezisztencia gén disztális oldalára térképezték az *Xgwm443* markert. Munkánk során az általuk kapcsoltnak talált másik 3 db SSR-t (*Xbarc21*, *Xgwm234* és *Xgwm544*) is

teszteltük, de populációinkban csak a *gwm234* amplifikált polimorf fragmentumot. A kapcsoltsági vizsgálat után megállapítottuk, hogy az általunk azonosított 6 SSR marker közül az *Xgwm234* helyezkedik el az *Lr52* rezisztencia génhez a legközelebb (7,2 cM). Obert és mtsai (2005) az általunk azonosított új rezisztencia génhez szorosan kapcsolt AFLP markert is azonosítottak, melyet STS markerre konvertáltak, és *Xtxw200*-nak nevezték el. Miután az SSR vizsgálatok eredményeiben hasonlóságot találtunk, megvizsgáltuk a *Xtxw200* STS marker kapcsoltságát is az általunk létrehozott F₂ populációban. Eredményeink azt mutatták, hogy populációinkban mind az *Xgwm234*, mind a *Xtxw200* marker a gén proximális oldalán helyezkedik el ellentétben Obert és mtsai (2005) publikációjával, ahol az *Xtxw200* az új rezisztencia gén disztális oldalán található. Ezek az eredmények nyitva hagyják azt a kérdést, hogy az Obert és mtsai (2005) által azonosított rezisztencia gén azonos-e az általunk vizsgált *Lr52* génnel vagy csak nagyon közel helyezkedik el hozzá. Ennek tisztázására érdemes lenne elvégezni az allélikus tesztet a két gén között.

4.3 Markerre alapozott szelekció és *Lr* gének azonosítása molekuláris markerek segítségével búzafajtákban

Az általunk indított, az *Lr20* rezisztencia gén beépítésére törekvő visszakeresztezéses programban a szelekcióhoz a domináns *Xsts638* markert (Neu és mtsai 2002) használtuk fel. Azonban a markerre alapozott szelekcióra előnyösebbek a kodomináns öröklődésű SSR markerek, amelyekkel már akár az F₂ generációban kiszűrhetőek a homozigóta egyedek. Az *Lr20* gén markerszelektációs munkájára a továbbiakban ezért már az általunk azonosított SSR markereket célszerű felhasználni. Bár az *Lr20* gén Magyarországon önmagában közepesen hatékony a levélrozsda fertőzés ellen (Vida és mtsai 2009), mégis célszerű a nemesítési programokba bevonni a genetikai diverzitás növelése érdekében akár más levélrozsda rezisztencia génekkel kombinálva is.

Az *Lr* génekhez kapcsolt molekuláris markerek egyik gyakorlati alkalmazása a rezisztencia gének azonosítása az egyes őszi búza fajtákban.

Vizsgálatainkban 222 Magyarországon 1970. és 2005. között regisztrált őszi búza fajtát vizsgáltunk meg az *Lr34*, *Lr20*, és *Lr52* rezisztencia gének azonosítása céljából a hozzájuk szorosan kapcsolt molekuláris markerek segítségével. Az *Lr34* gént a Magyarországon 1970-2005 között regisztrált őszi búza fajtákban a Lagudah és mtsai (2006) által leírt kodomináns STS (*csLV34* 0,4 cM) marker segítségével azonosítottuk. Hazánkban Wang és mtsai (2009) valamint Vida és mtsai (2009) szintén sikerrel alkalmazták az *XcsLV34* markert az *Lr34* gén azonosítására nemesítési vonalakban, martonvásári és külföldi fajtákban. Vizsgálataik során 12 db államilag elismert martonvásári búzafajtában mutatták ki a marker jelenlétét: Mv3, Mv13, Mv17, Mv Emese, Mv Garmada, Mv Gorsium, Mv Laura, Mv Mambó, Mv Pálma, Mv Palotás, Mv Táltos és Mv Vilma. A felsorolt fajtákban az Mv Gorsium és az Mv Laura (általunk nem vizsgált) kivételével mi is azonosítottuk az *Lr34* gén molekuláris markerét.

Az általunk vizsgált 222 fajta 23,0 %-a hordozza az *Lr34* gént. Kórtani tesztekkel már számos alkalommal vizsgálták az *Lr34* gén gyakoriságát szerte a világon. Winzeler és mtsai (2000) például az általuk vizsgált európai fajták 55 %-ánál mutattak ki felnőttkori rezisztenciát, amelyről feltételezték, hogy vagy az *Lr13* vagy az *Lr34* gén vagy ezek kombinációja okozza. Vizsgálataink megerősítik, hogy az *Lr34* gén hazai elterjedése nagyrészt a Bezostaja 1-nek köszönhető. A rendelkezésünkre álló természetes levélrozsa fertőzöttségi adatok (az MgSzH által közölt adatok) évenkénti értékelése után megállapítottuk, hogy az *Lr34* gént hordozó fajták többsége a rezisztens csoportba tartozik. Mivel ez a rezisztencia gén önmagában közepesen hatékony (Mesterházy és mtsai 2000), ezért feltételezhető, hogy más felnőttkori rezisztenciában megnyilvánuló génnel (pl.: *Lr13*) (Singh és mtsai 2000) vagy egy önmagában közepesen hatékonynak, vagy hatékonynak mondott rasszspecifikus rezisztencia génnel kombinálva van jelen a fajtákban (Kolmer és Oelke 2006). Bár az ezredfordulótól kezdve az *Lr34* gént a Magyarországon elismert fajták csupán egy negyede, mégis e gén rezisztencianemesítésben való alkalmazása továbbra is fontos feladat.

Munkánkban az *Xsts638* (Neu és mtsai 2002) és három, általunk azonosított SSR marker (*Xwmc809*, *Xgwm344*, *Xwmc273*) segítségével határoztuk meg a fajtákban az *Lr20* gént. A 222 vizsgált fajtából mindössze 3 (1,3 %) hordozza a gént. Eredményeink hasonlóak voltak, mint Winzeler és mtsai (2000) valamint Singh és mtsai (2001) által leírtak, akik az általuk vizsgált európai illetve angol fajták csupán 4 %-ában találták meg az *Lr20* gént speciális levélrozsdá izolátumok segítségével. Az *Lr52* gén búzafajtákban való előfordulását mindössze néhány fajtában említik (McIntosh és mtsai 1995). Munkánkban az általunk azonosított, a génhez szorosan kapcsolt (7,2 cM) SSR markerrel (*Xgwm234*) azonosítottuk a rezisztencia gén jelenlétét a 222 vizsgált fajtából 2 szegedi és egy osztrák nemesítésű búzafajtában. Magyarországon Manninger (2002) és Csősz (2007) is vizsgálta az *Lr52* gén csíranövénykori és felnőttkori rezisztenciáját, és megállapították, hogy mindkét esetben közepesen hatékony génnek bizonyult. Bár az *Lr52* gén nem gyakori, mégis a felnőttkori rezisztencia eredmények alapján javasolható az új fajtákba való beépítése más hatékony rasszspecifikus vagy nem rasszspecifikus rezisztenciát is okozó *Lr* génekkel kombinációban. Tekintve, hogy az alkalmazott markerek és az adott *Lr* gének kapcsoltsága nem teljes, további tesztek (kórtani tesztek speciális levélrozsdá izolátumokkal) is szükségesek a gének jelenlétének megerősítéséhez.

A rezisztens fajták eddig ismeretlen genetikai hátterének feltárása (rezisztenciagének azonosítása) valamint az egyre népszerűbbé váló MAS alkalmazása remélhetőleg rövid időn belül felgyorsítja a rezisztencia gének céltudatos beépítését a nemesítési vonalakba és fajtákba.

ÚJ ÉS ÚJSZERŰ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Kísérleteinket a rezisztencia nemesítés területén végeztük. A dolgozat első felében leírt molekuláris markerek alkalmazhatók a rezisztencia gének jellemzésére, térképezésére, valamint a MAS számára is. A molekuláris markerek gyakorlati alkalmazása, amelyet a dolgozat második felében ismertettem hasznos információval szolgálhat a növénynemesítők számára a fajtákban előforduló rezisztencia gének megismerése során.

Munkánk során az alábbi új eredményeket értük el:

1. Hat új, az *Lr20* génhez kapcsolt SSR (*Xcfa2240*, 3,8 cM, *Xwmc525*, 3,3 cM, *Xwmc273*, 2,8 cM, *Xwmc809*, 0,5 cM, *Xgwm344*, 0,5 cM, *Xcfa2257*, 12,8 cM) markert azonosítottunk és térképeztünk.
2. Sikerült azonosítani egy, az *Lr20* gén disztális oldalán elhelyezkedő SSR markert (*Xcfa2257*, 12,8 cM).
3. Térképező populációinkban az *Xsts638* (0,4 cM; Neu és mtsai 2002) domináns markert jelentősen távolabbra (4,9 cM-ra) térképeztük az *Lr20* géntől.
4. Új RAPD (*Xopr10*, 18,2 cM), STS (*Xtxw200*, 3,6 cM) és 6 SSR (*Xgwm133*, 22,1 cM, *Xgwm234*, 7,2 cM, *Xgwm443*, 44,6 cM, *Xwmc149*, 11,3 cM, *Xwmc630*, 26,9 cM és *Xcfd20*, 46,5 cM) markert azonosítottunk és térképeztünk az *Lr52* génhez.
5. Az *Lr52* génhez kapcsolt általunk azonosított markerek közül az *Xtxw200* (3,6 cM) domináns öröklődésű STS, valamint az *Xgwm234* (7,2 cM) és az *Xwmc149* (11,3 cM) kodomináns öröklődésű SSR közelebb térképeződött, mint az irodalomból ismert *Xgwm443* (16,5 cM; Hiebert és mtsai 2005).

6. 1970-2005 között Magyarországon elismert 222 db búzafajtában molekuláris markerek segítségével azonosítottuk az *Lr52*, *Lr20* és *Lr34* géneket és mértük gyakoriságukat. Megállapítottuk, hogy mind az *Lr52*, mind az *Lr20* gén igen alacsony gyakorisággal (1,3%) fordult elő. Az *Lr34* gén viszont jelentős mértékben elterjedt a hazánkban termesztett fajtákban (23,0 %-os gyakoriság).

7. A fajták 1985 és 2003 között megfigyelt szántóföldi természetes fertőzöttségi adatai alapján megállapítottuk, hogy az *Lr34* gént hordozó fajták több év átlagában szignifikánsabban rezisztensebbek, mint a gént nem hordozók.

8. TREMMELNÉ TAR MELINDA TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

Tudományos impakt faktoros angol nyelvű cikkek:

Blaszczyk L, Chelkowski J, Korzun V, Kraic J, Ordon F, Ovesna J, Purnhauser L, Tar M, Vida G. (2004) Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories. *Cell Mol Biol Lett.* 9: 805-817.

M. Tar, L. Purnhauser and M. Csősz (2008) Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr52* leaf rust resistance gene of wheat. *Cereal Research Communication.* 36(3): 409-415

Tudományos lektorált magyar nyelvű cikk

Purnhauser László, Csősz Mária, Tar Melinda és Mesterházy Ákos (2008) Molekuláris markerek felhasználása a búza rozsdabetegségekkel szembeni rezisztencianemesítésében *Növényvédelem* 44(7): 333-339

Egyéb tudományos cikk

Purnhauser L., M. Tar, G. Kaszony, M. Csősz, and A. Mesterhazy (2005) Use of molecular markers in the resistance breeding to rust diseases and Fusarium head blight in wheat. *Annual Wheat Newsletter.* Vol. 51.

Angol nyelvű konferencia kiadvány (proceeding)

M Tar, L Purnhauser, L Csősz, Á Mesterházy, G Gyulai (2002) Identification of molecular markers for an efficient leaf rust resistance gene (*Lr29*) in wheat. *Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology. Acta Biologica Szegediensis* 46. (2-3) 133-134

Purnhauser L, Tar M., Bona L, Lang L (2008) The occurrence of Sr31 and Sr36 stem rust resistance genes in wheat cultivars registered in Hungary in the past 25 years. (2008) *The 11th International Wheat Genetics Symposium proceedings* <http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/3415/1/P152.pdf>

Angol nyelvű előadás összefoglalás, poszter

M Tar, L Purnhauser, L Csósz, Á Mesterházy, G Gyulai (2002) Identification of molecular markers for an efficient leaf rust resistance gene (Lr29) in wheat. 6th Conference of European Foundation For Plant Pathology. Poster abstract in Disease Resistance in Plant Pathology Abstract Book pp.102.

M Tar, L Purnhauser, L Csosz, A Mesterhazy, G Gyulai (2003) Identification and application of molecular markers for Lr29 wheat leaf rust resistance gene. XII. Conference Workshop on „Microscopic Funghi-Host Resistance Genes, Genetics and Molecular Research” Poznan, Poland Poster Abstract Book pp.86-88.

Melinda Tar, Laszlo Purnhauser, Maria Csosz, Akos Mesterhazy (2004) Identification of molecular markers linked to the wheat leaf rust resistance gene Lr20. 11th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, England, Norwich. Conference Abstract Book (poster)

Melinda Tar, Laszlo Purnhauser, Maria Csosz, Akos Mesterhazy (2004) Identification and application of molecular markers linked to the Lr20 wheat leaf rust resistance gene. The VI. International Symposium „Young people and multidisciplinaryresearch” 23-24 September 2004 Romania-Serbia and Muntenegru-Hungary, Romania, Timisoara Abstract Book pp.41 (oral presentation)

Magyar nyelvű előadás összefoglalás, poszter

Tar M, Purnhauser L, Csósz L, Mesterházy Á, Gyulai G (2002) Molekuláris markerek azonosítása az *Lr29* levélrozsdá rezisztenciagénre búzában. VIII: Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Összefoglalók pp. 23. (előadás)

Tar M, Beke B, Muzslay M, Ács P, Purnhauser L (2003) A Magyarországon elismert durum búzafajták molekuláris variabilitásának vizsgálata. IX. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Összefoglalók pp. 27. (előadás)

Tar M, Purnhauser L, Csósz L-né, Mesterházy Á (2004) Az *Lr20* levélrozsdá rezisztencia génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, Összefoglalók pp. 156 (poszter)

Tar Melinda, Purnhauser László, Csósz Lászlóné, Mesterházy Ákos (2005.) SSR és AFLP markerek azonosítása az *Lr20* levélrozsdá rezisztencia génre búzában. XI. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Összefoglalók pp.49 (előadás)

Tar Melinda, Purnhauser László, Csósz Lászlóné, Mesterházy Ákos (2006)
PCR-alapú molekuláris markerek azonosítása az *Lr52* levélrozsdá rezisztencia génre búzában. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Összefoglalók pp.50 (előadás)

Tar Melinda, Szalay Rita, Nagyné Kutni Rozália, Pálvölgyi László (2006)
Olajipari és étkezési napraforgó vonalak genetikai távolságának meghatározása RAPD technikával. XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, Összefoglalók pp.51 (előadás)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnnek Dr. Purnhauser Lászlónak a munkafeltételek biztosításáért, szakmai támogatásáért és hasznos tanácsaiért.

Hálával tartozom Dr. Matuz János igazgató úrnak és a Gabonakutató Kft. minden dolgozójának tanulmányaim szakmai és erkölcsi támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom Csősz Lászlóné Dr. Gyuris Máriának a fenotípusos vizsgálatok elvégzésében nyújtott szakmai tanácsaiért, valamint azért, hogy rendelkezésemre bocsátotta az általa előállított levélrozsa monospórák izolátumokat. Köszönöm a dolgozat javításához adott tanácsait, szakmai segítségét.

Köszönetemet fejezem ki továbbá Pusztai Lászlónénak † és Nagyhaska Editnek, hogy hasznos technikai tanácsaikkal segítették a fenotipizálási munkákat valamint köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Lajtár Tímeának, Selyemné Frank Szilviának, Fónad Péternének a laboratóriumi munkában és Becsey Magdolnának a szántóföldi és üvegházi munkában nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm Búza Lajosnénak és Fejes Erzsébetnek az angol nyelvű fordításban nyújtott segítséget és Kocsis Zoltán pályázati referensnek a dolgozat formai szerkesztésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Kertész Zoltánnak, hogy az általa vezetett, doktoranduszok foglalkoztatására és munkájuk támogatására elnyert pályázat (OTKA TS 40887) egyik résztvevője lehettem. Köszönöm Prof. Dudits Dénes, akadémikus úrnak a kutatási részvételt az általa vezetett két konzorciumban (NKFP_4/023/2001; KPI_4/064/2004).

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Családomnak, hogy szeretetükkel támogattak, és biztosították a munkához nélkülözhetetlen nyugodt környezetet.