

BÚZA-*Aegilops biuncialis* 3M-4B CENTRIKUS FÚZIÓ ÉS 3M(4B) SZUBSZTITÚCIÓS VONAL ELŐÁLLÍTÁSA ÉS MOLEKULÁRIS CITOGENETIKAI JELLEMZÉSE

MOLNÁR ISTVÁN, CSEH ANDRÁS ÉS LÁNGNÉ MOLNÁR MÁRTA

¹MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

2M^b, 3M^b, 7M^b és 3U^b búza-*Ae. biuncialis* addíciós vonalakat kereszteztünk a CS*ph1b* mutánsal búza-*Ae. biuncialis* transzlokációk létrehozásának céljával. Az F₁ hibridek meióziséban GISH segítségével kimutattuk búza-*Aegilops* bivalensek és trivalensek képződését. A búza-*Aegilops* kromoszóma asszociációk gyakorisága az egyes *Aegilops* kromoszómák esetén 2M^b>3M^b>3U^b>7M^b sorrendben változott. Az F₃ nemzedékben repetitív DNS próbák (Afa family, pSc119.2, pTa71) (FISH) és M genom specifikus próbák (GISH) együttes alkalmazásával 4 növényben 3M^b(4B) szubsztitúció, 5 növényben 3M^b-4B centrikus fúzió volt azonosítható. A citológiai vizsgálatok megállapításait támasztotta alá, hogy a 3M^b-4BS centrikus fúziókat tartalmazó vonalak csak a 4B kromoszóma rövid karján lokalizált SSR markerekkel (Xbarc1045, Xgwm113, Xgwm368) adtak specifikus terméket, míg a 3M^b(4B) szubsztitúciós vonalak sem a 4B rövid- sem a hosszú karján (Xgwm149, Xgwm251, Xgwm165) lokalizált markerekkel nem adtak termékeket. Az előállított szubsztitúciós és transzlokációs vonalak felszaporítása folyamatban van, melyet agronómiai értékelésük követhet.

Kulcsszavak: *Ae. biuncialis*, *T. aestivum*, kromoszómapárosodás, szubsztitúció, transzlokáció

DEVELOPMENT AND MOLECULAR CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF WHEAT-*Aegilops biuncialis* 3M-4B CENTRIC FUSION AND 3M(4B) SUBSTITUTION LINES

I. MOLNÁR, A. CSEH AND M. MOLNÁR-LÁNG

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

The *T. aestivum*-*Ae. biuncialis* disomic addition lines 2M^b, 3M^b, 7M^b and 3U^b were crossed with the CS*ph1b* genotype in order to develop wheat-*Aegilops* translocations. The presence of wheat-*Aegilops* chromosome pairing (bivalents and trivalents) was detected by GISH at meiotic metaphase I in F₁ hybrids. The wheat-*Aegilops* pairing frequency decreased in the following order: 2M^b > 3M^b > 3U^b > 7M^b. In the F₃ generation a 3M^b(4B) substitution was identified in four plants and 3M^b-4BS centric fusions were detected in five plants by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using repetitive DNA probes (Afa family, pSc119.2, pTa71) and by genomic *in situ* hybridization (GISH) using M genome-specific probes. These results were supported by SSR marker analysis, as only the markers specific for the short arm of chromosome 4B (Xbarc1045, Xgwm113, Xgwm368) produced the expected PCR product in the 3M^b-4BS centric fusions, while no products were detected with markers specific for 4BS and 4BL (Xgwm149, Xgwm251, Xgwm165) in the 3M^b(4B) substitution lines. After multiplying the seed, the agronomic evaluation of these substitution and translocation lines is planned.

Key words: *Ae. biuncialis*, *T. aestivum*, chromosome pairing, substitution, translocation

Bevezetés

A kecskebúza (*Aegilops biuncialis* Vis.) ($2n=4x=28$; $U^bU^bM^bM^b$) búzával való keresztezhetősége, valamint szárazságtűrése és számos rozsda betegséggel szembeni ellenálló képessége (Molnár et al. 2004, Damania and Pecetti 1990) révén a termesztett búza egyik potenciális génforrása. A genetikailag stabil szubsztitúciós és transzlokációs vonalak létrehozása révén a kecskebúza hasznos tulajdonságai átvihetők a búzába. Az *Aegilops* kromoszóma szegmentumok átviteléhez alkalmazható módszerek egyike a homeológ rekombináció kiváltása a búza és az *Aegilops* kromoszómák között. A hexaploid búzában a homeológ kromoszómák közti párosodást és ezen keresztül a köztük bekövetkező rekombinációt gátolja az 5B kromoszóma hosszú karján található *Ph1* gén (Riley and Chapman 1958). A Chinese Spring *ph1b* mutáns (*CSph1b*) genotípusa nem rendelkezik funkcionális *Ph1* génnel (Sears 1977). Búza-*Ae. biuncialis* diszómás addíciós vonalakat a *CSph1b* mutánssal keresztezve a létrehozott F_1 nemzedékben búza-*Aegilops* párosodás és rekombináció várható. A homozigóta idegenfajú transzlokációk jó eséllyel válogathatók ki az F_3 nemzedékben.

A jelölt repetitív DNS szekvenciákat próbaként használó fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) és az *Ae. biuncialis* diploid őseinek jelölt genomi DNS-ét alkalmazó genomi *in situ* hibridizáció (GISH) segítségével kiválóan tanulmányozható az *Ae. biuncialis* kromatin jelenléte a termesztett búza genomja mellett (Molnár et al. 2009a).

Kísérleteinkben a búza-*Ae. biuncialis* addíciós vonalak és a *CSph1b* mutáns keresztezésével előállított F_1 hibridek meióziséban GISH segítségével vizsgáltuk a búza-*Aegilops* kromoszómapárosodások gyakoriságát, majd az F_3 nemzedék genomösszetételét FISH és GISH együttes alkalmazásával jellemeztük.

Anyag és módszer

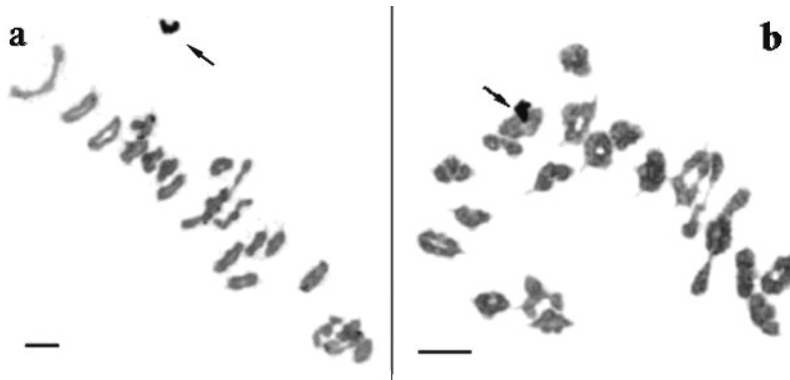
A $2M^b$, $3M^b$, $7M^b$ és $3U^b$ *T. aestivum* (Mv9kr1)-*Ae. biuncialis* diszómás addíciós vonalakat kereszteztük a *CSph1b* genotípussal. Az F_1 nemzedékben az antérák begyűjtése és a meiotikus kromoszóma preparátumok előállítása Molnár et al. (2009b) által leírtak szerint történt. A búza-*Aegilops* kromoszómapárosodások gyakoriságát a meiózis első metafázisában vizsgáltuk GISH-sel. Az öntermékenyítéssel előállított F_3 nemzedék mitotikus kromoszóma preparátumain FISH és GISH segítségével vizsgáltuk a búza-*Aegilops* kromoszóma átrendeződések jelenlétét.

A GISH során használt M és U genom specifikus próbák, valamint a FISH során alkalmazott repetitív DNS próbák (Afa family, pSc119.2, pTa71) előállítása Molnár et al. (2009a) által leírt módon történt. A pSc119.2 próbát biotinnal, az Afa-family próbát digoxigeninnel a pTa71 próbát 50-50% biotinnal és digoxigeninnel jelöltük. A mitotikus kromoszómapreparátumok előkezelései, a hibridizáció és az azt követő mosási lépések a Molnár et al. (2009a) által leírt módon történtek. A digoxigeninnel illetve biotinnal jelölt repetitív DNS próbák hibridizációs jeleit anti-digoxigenin-Rhodamin és streptavidin-FITC alkalmazásával tettük láthatóvá vörös ill. zöld színekkel. A repetitív próbák hibridizációs jelének rögzítése (Zeiss Axioskop-2 fluoreszcens mikroszkóp, Spot CCD camera) majd lemosása után a preparátumokhoz M vagy U genom specifikus próbákat hibridizáltunk. A GISH egyes lépései megegyeztek a FISH során alkalmazottakkal. A meiotikus preparátumok esetében csak GISH-t alkalmaztunk.

A 4B kromoszóma rövid (Xbarc1045, Xgwm113, Xgwm368) és hosszú (Xgwm149, Xgwm251, Xgwm165) karján lokalizált SSR markerek (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/quickquery.shtml#microsats>) analízise a Sepsi and Bucsi (2009) által leírt módon történt.

Eredmények és következtetések

Az F₁ hibridek meiózisének első metafázisában az *Ae. biuncialis* kromoszómák egyértelműen megkülönböztethetőek voltak a sötét hibridizációs jel alapján (1. ábra). Minden keresztezési kombináció esetén a leggyakoribb meiotikus konfiguráció a 21 búza bivalens +1 *Aegilops* univalens volt (1a ábra). Kisebb gyakorisággal megfigyelhető volt a búza-*Aegilops* kromoszómapárosodások (bivalensek és trivalensek) kialakulása is (1b ábra). Az egyes *Aegilops* kromoszómák eltérő gyakorisággal párosodtak a búza kromoszómákkal (1. táblázat) (a köztük lévő különbségek $p=0,05$ szinten szignifikánsak voltak). A búza-*Aegilops* kromoszóma asszociációk gyakorisága az egyes *Aegilops* kromoszómák esetén a következő sorrendben változott: $2M^b > 3M^b > 3U^b > 7M^b$. A megfigyelt különbségek arra utalhatnak, hogy a búza – *Aegilops* homeológia viszonyok a $2M^b$ és $3M^b$ kromoszómák esetén szorosabbak, mint a $3U^b$ vagy a $7M^b$ esetén. Ennek hátterében az evolúció során bekövetkezett (intra- és intergenomikus-) strukturális átrendeződések folytán a búza és *Aegilops* kromoszómák kódoló és nem-kódoló régióinak eltérő sorrendisége állhat (Zhang *et al.* 1998).



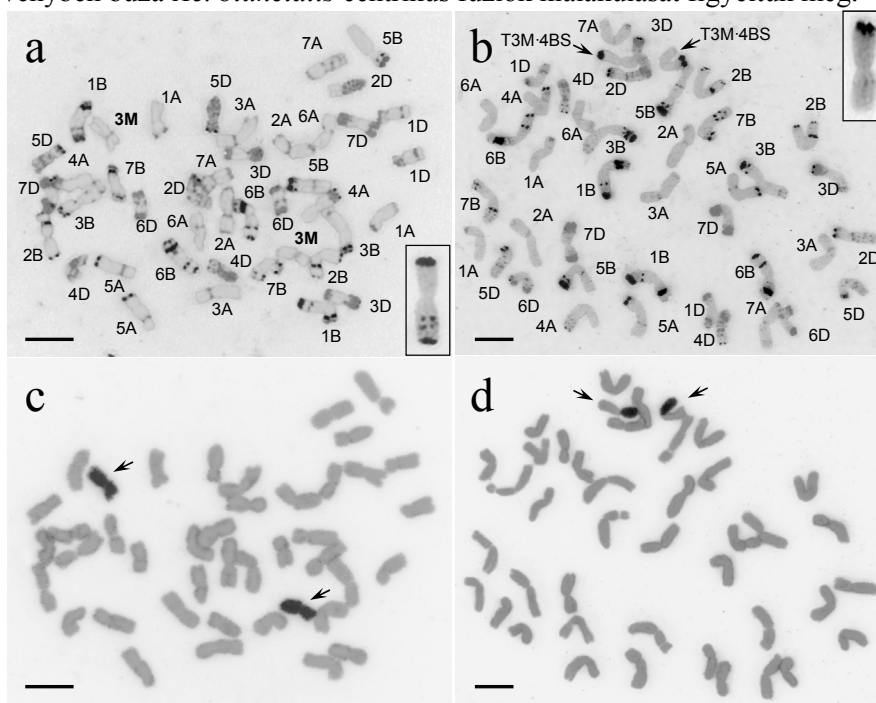
1. ábra Az Mv9kr1-*Ae. biuncialis* addíciós vonalak x CSph1b F₁ hibridjeinek meiózisa a GISH-t követően. **a** meiózis búza-*Aegilops* kromoszómapárosodás nélkül ($7M^b$ monoszómás addíció, $21^{II} + 1^I$), **b** búza-*Aegilops* kromoszómapárosodást mutató meiózis ($3U^b$ monoszómás addíció, $20^{II} + 1^{III}$). A nyilak a sötétén jelölődött *Ae. biuncialis* kromoszómákat jelölik. Skála: 10 μ m.

Az F₃ nemzedékben repetitív DNS próbákkal (pSc119.2, Afa family, pTa71) végzett FISH eredményeként minden kromoszóma azonosítható volt. Az M genom specifikus próba segítségével az M kromoszómák kimutathatóak voltak (2. ábra). Négy növényben 42-es kromoszómaszám mellett a 4B kromoszómapár kicserélődött 2 db $3M^b$ *Ae. biuncialis* kromoszómára, így ezek

1. táblázat Búza–*Aegilops* kromoszómapárosodási konfigurációk gyakorisága a búza–*Ae. biuncialis* addíciós vonalak és a *CSph1b* kresztezésekkel létrehozott F₁ hibridek (2M^b, 3M^b, 7M^b, 3U^b) meióziséban

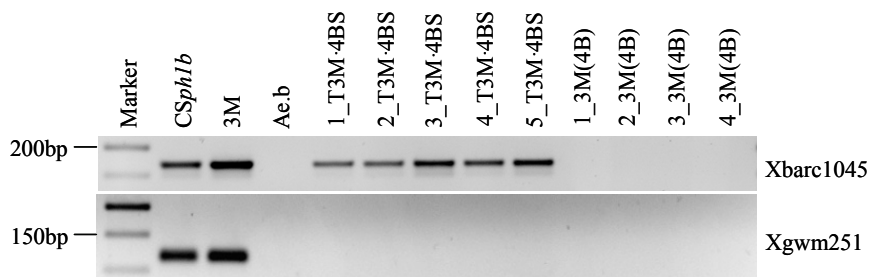
	Sejt (db)	Búza– <i>Ae. biuncialis</i> párosodási konfigurációk				Átlag
		Nyílt II	Zárt II	III	Total	
2M ^b	57	0	0	14	14	0.245
3M ^b	113	6	0	7	13	0.115
7M ^b	87	0	0	0	0	0
3U ^b	139	0	1	3	4	0.028

a növények 3M(4B) diszómás szubsztitúciós vonalnak tekinthetők. További 5 növényben búza–*Ae. biuncialis* centrikus fúziók kialakulását figyeltük meg.



2. ábra A 3M(4B) búza–*Ae. biuncialis* szubsztitúciós (a, c) és 3M-4BS transzlokációs (b, d) vonalak szomatikus kromoszómái a FISH (a-b) és GISH (c-d) után. Inzert: a hiányzó 4B kromoszóma (a) és a 3M-4BS transzlokációs kromoszóma (b). A FISH képeken a pSc119.2 és pTa71 próbákat sötétebb, míg az Afa family próbát világosabb sávok jelölik. A GISH képeken a nyílak a sötétén jelölődött *Ae. biuncialis* kromoszómákat jelölik. Skála: 10 μm.

A FISH eredményeként megállapítható volt, hogy a 4B kromoszóma rövid karja és a 3M^b kromoszóma eddig nem azonosított karja fuzionált egymással. A 3M^b-4BS centrikus fúziók homozigóta állapotban fordultak elő a 42 kromoszómával rendelkező növényekben. A citológiai vizsgálatok megállapításait támasztotta alá, hogy a 3M^b-4BS centrikus fúziókat tartalmazó vonalak csak a 4B kromoszóma rövid karján lokalizált SSR markerekkel (Xbarc1045, Xgwm113, Xgwm368) adtak specifikus terméket, míg a 3M^b(4B)



3 ábra A 4B kromoszóma rövid (Xbarc1045) és hosszú karjára (Xgwm251) specifikus SSR markerek elektroforézis mintázata a 3M-4BS centrikus fúziók (1-5T_3M-4BS), 3M(4B) szubsztitúciós vonalak (1-4_3M(4B)) valamint a szülői genotípusok (3M addíciós vonal, CSph1b, *Ae. biuncialis* MvGB642) esetében.

szubsztitúciós vonalak sem a 4B rövid- sem a hosszú karján (Xgwm149, Xgwm251, Xgwm165) lokalizált markerekkel nem adtak termékeket (3. ábra). Az előállított szubsztitúciós és transzlokációs vonalak genetikailag stabilak, felszaporításuk folyamatban van, melyet agronómiai értékelésük követhet.

Köszönetnyilvánítás

A kutatásokat a NKFP Búzakalász Konzorcium (OM-00018/2004), az OTKA Iroda (K 67808) és az AGRISAFE 203288, EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázatok támogatták.

Irodalom

- Damania, A.B., Pecetti, L. (1990): Variability in a collection of *Aegilops* species and evaluation for yellow rust resistance at two locations in Northern Syria. *J. Genet. Breed.* **44**: 97-102.
- Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M., Galiba, G. (2004): Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Funct. Plant Biol.* **31**: 1149-1159.
- Molnár, I., Benavente, E., Molnár-Láng, M. (2009a) Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum/Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic *in situ* hybridization. *Genome*, **52**: 156-165.
- Molnár, I., Molnár-Láng, M. (2009b) GISH reveals different levels of meiotic pairing with wheat for individual *Aegilops biuncialis* chromosomes. *Biologia Plantarum*, accepted
- Sepsi, A. and Bucsi, J. (2009): Physical mapping of the 7D chromosome using a wheat/barley translocation line (5HS.7DL) produced in a Martonvásári wheat background using microsatellite markers. *Cereal Res. Commun.* Accepted
- Riley, R., Chapman, V.(1958): Genetic control of cytologically diploid behaviour of hexaploid wheat. - *Nature* **182**: 713-715.
- Sears, E.R.(1977): An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. - *Can. J. Genet. Cytol.* **19**: 585-593.
- Zhang, H., Jia, J., Gale, M.D., Devos, K.M. (1998): Relationships between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. - *Theor. Appl. Genet.* **96**: 69-75.