

KECSKEBÚZA FAJOK (*Aegilops biuncialis* és *Ae. geniculata*)
KROMOSZÓMÁIRA SPECIFIKUS MOLEKULÁRIS MARKEREK
KIFEJLESZTÉSE

SCHNEIDER ANNAMÁRIA, MOLNÁR ISTVÁN ÉS LÁNGNÉ MOLNÁR MÁRTA

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

Kísérleteink során célunk volt az *Aegilops* fajok U és M genom kromoszómáira specifikus búza simple sequence repeat (SSR) markerek kiválogatása. Vizsgálataink során összesen 119 db búza SSR markert teszteltünk az *Aegilops biuncialis*-on, az *Ae. geniculata*-n, öt búza-*Ae. biuncialis* addíciós vonalon és a búza-*Ae. geniculata* addíciós sorozaton. A vizsgált búza mikroszatellit markerek 25,21%-a (30 db) mutatott eltérő hosszúságú, polimorf sávot az *Ae. biuncialis*-on a búzához képest. Ezen polimorf markerek közül 3db (10%) mutatott kromoszóma specifikitást a búza-*Ae. biuncialis* és búza-*Ae. geniculata* addíciós vonalakon. Az Xgwm44 és az Xgdm61 markerek az *Ae. biuncialis* 2M és 3M kromoszómájára specifikusak. Az Xbarc184 primer esetében az *Ae. geniculata* 7U kromoszómájára specifikus sávot figyeltünk meg a 7U búza-*Ae. geniculata* addíciós vonalon.

Kulcsszavak: *Aegilops biuncialis*, *Aegilops geniculata*, addíciós vonalak, búza SSR markerek, polimorfizmus

PRODUCTION OF MOLECULAR MARKERS SPECIFIC TO
CHROMOSOMES OF GOATGRASS SPECIES
(*Aegilops biuncialis* and *Ae. geniculata*)

A. SCHNEIDER, I. MOLNÁR, AND M. MOLNÁR-LÁNG

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

The aim of the experiments was to select wheat simple sequence repeat (SSR) markers specific for the U and M genomes of *Aegilops* species. In the course of the work a total of 119 wheat SSR markers were tested on *Aegilops biuncialis*, on *Ae. geniculata*, on five wheat-*Ae. biuncialis* addition lines and on an addition series of wheat-*Ae. geniculata*. Compared with wheat, polymorphic bands of various lengths were detected on *Ae. biuncialis* for 25.21% (30) of the wheat microsatellite markers. Three of these (10%) exhibited chromosome specificity on the wheat-*Ae. biuncialis* and wheat-*Ae. geniculata* addition lines. The markers Xgwm44 and Xgdm61 were specific to *Ae. biuncialis* chromosomes 2M and 3M. A band specific to the 7U chromosome of *Ae. geniculata* was observed for the Xbarc184 primer on the 7U wheat-*Ae. geniculata* addition line.

Key words: *Aegilops biuncialis*, *Aegilops geniculata*, addition lines, wheat SSR markers, polymorphism

Bevezetés

Az *Aegilops biuncialis* Vis. ($2n=4x=28$, $U^bU^bM^bM^b$) az *Aegilops* nemzetségbe tartozó, allo-tetraploid, a termesztett búzával közeli rokonságban álló vad faj, amely egyes vonalai só- és szárazságtűrők (Molnár et al. 2004), míg más vonalai különböző rozsda rezisztencia géneket hordoznak (ld. Schneider et al. 2008). Az *Aegilops* fajokban fellelhető hasznos tulajdonságok búzába történő beépítésének egyik módja az addíciós, majd transzlokációs vonalak létrehozása. Ezekben a genetikai alapanyagokban fontos az idegen kromoszómák és kromoszóma szegmentumok nyomon követése, melyre alkalmas módszer az *in situ* hibridizáció. Az *Aegilops* fajok nagy genetikai változatossága, azonban az egyes kromoszómák fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) mintázataiban nagy variabilitást, polimorfizmust okoz (Schneider et al. 2005). A nagyfokú FISH polimorfizmus miatt az *Ae. biuncialis* kromoszómáinak azonosítását célszerű lenne molekuláris (mikroszatellit, SSR) markerek segítségével alátámasztani.

Az SSR markereket sikeresen alkalmazták búza genetikai térképek készítésére (Röder et al. 1998, Pestsova et al. 2000, Somers et al. 2004). Az SSR markerek széleskörű alkalmazása ellenére az *Aegilops* fajok U és M genomjának kromoszómáira specifikus mikroszatellit markereket nem írtak le, ezért kísérleteinkben célul tűztük ki U és M genom specifikus PCR-alapú SSR markerek kifejlesztését. Eddig a termesztett búzán (*Triticum aestivum* L. $2n=6x=42$, AABBDD) számos kromoszóma-specifikus SSR markert írtak le (Röder et al. 1998, Pestsova et al. 2000, Somers et al. 2004), melyek egy része a termesztett búza és az *Ae. biuncialis* közeli rokonságából adódóan az *Ae. biuncialis*-on is ad sávot. Kísérleteink során célunk volt először azoknak a markereknek a kiválogatása, melyek az *Ae. biuncialis*-on polimorf sávot adnak a búzához képest. Célunk volt továbbá a polimorf terméket adó markerek közül kiválogatni azokat, melyek kromoszóma specifikusságot mutatnak a búza-*Ae. biuncialis* (Schneider et al. 2005) és a búza-*Ae. geniculata* (Friebe et al. 1999) addíciós vonalakon.

Anyag és módszer

Növényi anyagok

Mv9kr1 búzatörzs (Molnár- Láng et al. 1996)

Mv25 búzafajta

Aegilops biuncialis MvGB642 (Martonvásári Gabona Génbank)

Ae. geniculata MvGB613 és MvGB434

Búza (*Triticum aestivum* L. cv. Mv9 kr1) -*Ae. biuncialis* 2M, 3M, 7M, 3U, 5U addíciós vonalak (Schneider et al. 2005) és két azonosítatlan addíciós vonal (49.001102 és 33.010130, későbbiekben 49-es és 33-as vonal)

Búza (*Triticum aestivum* L. cv. Chinese Spring) -*Ae. geniculata* addíciós vonalak (1U, 2U, 3U, 4U, 5U, 7U, 1M, 2M, 4M, 5M, 6M és 7M; Friebe et al. 1999)

PCR amplifikáció

A PCR reakciókat az Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Németország) PCR készülék segítségével hajtottuk végre a Nagy et al. (2003) által leírt módon. A PCR terméket 1,5% -os agaróz gélen futtattuk, a sávokat etídium-bromidos festéssel vizualizáltuk. A géleket egy Syngene G Box géldokumentációs rendszer (Syngene, Cambridge, Egyesült Királyság) segítségével fotóztuk le. A PCR reakciókat és a gélfuttatást három ismétlésben végeztük, hogy biztosak lehessünk a polimorf sávok jelenlétében ill. az egyes markerek kromoszóma specifikusában.

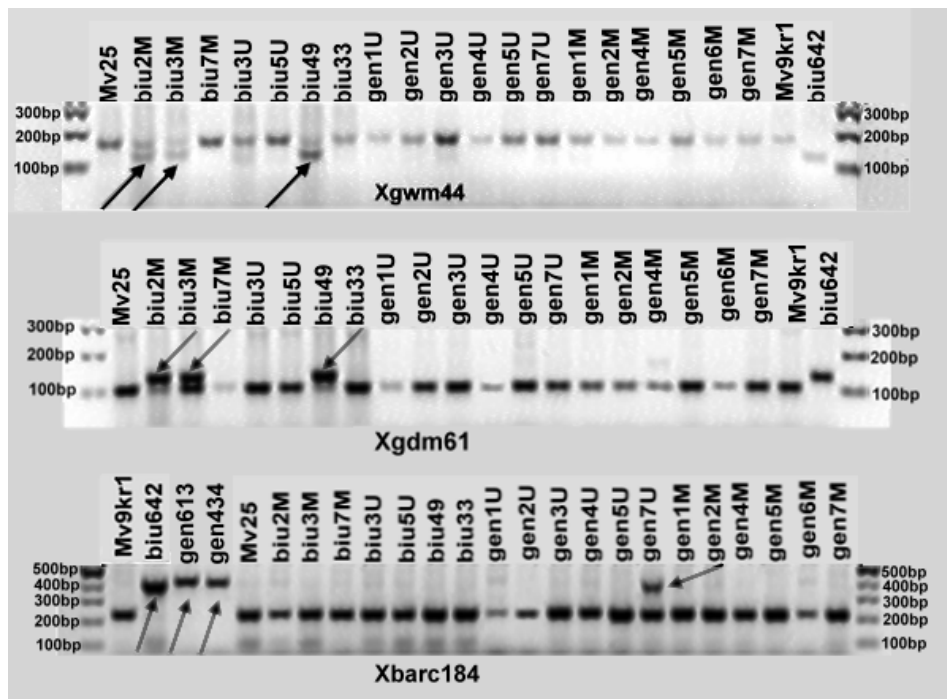
Eredmények

Kísérleteink során összesen 119 db búza SSR markert vizsgáltunk az Mv9 kr1 búzatörzsön és az *Ae. biuncialis*-on. Jelen munka során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált búza mikroszatellit markerek 50,42%-a (polimorf vagy nem polimorf) adott PCR terméket az *Ae. biuncialis*-on. A 119 db marker közül 49 db (41,17%) nem mutatott polimorfizmust az Mv9 kr1 és az *Ae. biuncialis* között. A tesztelt 119 db marker közül 30 db (25,21%) az Mv9 kr1 búzatörzsön adott sávot, míg *Ae. biuncialis*-on nem keletkezett PCR termék. A vizsgált búza SSR markerek közül 30 db (25,21%) adott PCR terméket a búzán és az *Ae. biuncialis*-on is, azonban a fragmenthosszuk különbözött. Ezeket az *Ae. biuncialis*-on is terméket adó polimorf markereket teszteltük a búza-*Ae. biuncialis* 2M, 3M, 7M, 3U, 5U és két ismeretlen addíciós vonalon (Schneider et al. 2005) és a búza-*Ae. geniculata* 1U, 2U, 3U, 4U, 5U, 7U, 1M, 2M, 4M, 5M, 6M és 7M addíciós vonalakon (Friebe et al. 1999). A 30 db polimorf és az *Ae. biuncialis*-on is terméket adó primerpárok közül 3 db (10%) bizonyult kromoszóma specifikusnak. A többi 27 db polimorf marker feltehetően nem a 2M, 3M, 7M, 3U és 5U *Ae. biuncialis* kromoszómákon lokalizálható, hanem olyan *Ae. biuncialis* kromoszómákon, melyekből nem rendelkezünk addíciós vonallal. A vizsgált 119 db búza mikroszatellit marker közül 10 db (8,40%) nem adott sávot sem az *Ae. biuncialis*-on sem a búzán.

Az Xgwm44, a búza 7D kromoszómájára specifikus markerrel a búzára jellemző 176 bp hosszú (Röder et al. 1998) PCR termék mellett megfigyeltünk egy, a búzára jellemző sávnál kisebb fragmentumot a búza-*Ae. biuncialis* 2M, 3M és 49-es azonosítatlan addíciós vonalain. Az *Ae. biuncialis* 2M, 3M és egy ismeretlen kromoszómájára specifikus marker sávja kb. 150 bp hosszú (1. ábra). Ez a sáv nem volt látható a búza-*Ae. geniculata* 2M addíciós vonalon.

Az Xgdm61, (Pestsova et al. 2000) a búza 4D kromoszómájára specifikus markerrel a búzára jellemző 124 bp hosszú DNS fragmentum mellett egy a búza PCR termékénél nagyobb DNS fragmentumot láttunk a búza-*Ae. biuncialis* 2M, 3M és 49-es azonosítatlan addíciós vonalain. Az *Ae. biuncialis* 2M, 3M és a 49-es azonosítási számú ismeretlen addíciós vonal kromoszómájára specifikus marker sávja kb. 150 bp hosszú (1. ábra). Ez a sáv nem volt megfigyelhető a búza-*Ae. geniculata* 2M addíciós vonalon (1. ábra).

Az Xbarc184, (Somers et al. 2004) 7D és 4A kromoszóma specifikus marker esetében a búzára jellemző sáv mellett, amely kb. 200 bp hosszú, egy nagyobb kb. 400 bp hosszú DNS fragmentum jelent meg az *Ae. biuncialis*-on, az *Ae. geniculata*-n és a búza-*Ae. geniculata* 7U addíciós vonalon. Az Xbarc184 markerrel kismértékű polimorfizmust figyeltünk meg az *Ae. biuncialis* MvGB642 és az *Ae. geniculata* MvGB613 és MvGB434 sávhossza között (1. ábra).



1. ábra: Az Xgwm44, Xgdm61 és Xbarc184 *Aegilops* kromoszóma specifikus markerek sávmintázata az Mv9kr1 (Mv9kr1), Mv25 (Mv25) búza genotípusokon, az *Ae. biuncialis* MvGB642 vonalán (biu642), a 2M, 3M, 7M, 3U, 5U és két azonosítatlan búza-*Ae. biuncialis* addíciós vonalon (biu2M, biu3M, biu7M, biu3U, biu5U, biu49, biu33) és a búza-*Ae. geniculata* 1U, 2U, 3U, 4U, 5U, 7U, 1M, 2M, 4M, 5M, 6M és 7M addíciós vonalakon (gen1U, gen2U, gen3U, gen4U, gen5U, gen7U, gen1M, gen2M, gen4M, gen5M, gen6M, gen7M). Az *Ae. biuncialis* és az *Ae. geniculata* kromoszómáira specifikus sávokat nyilakkal jelöltük.

Következtetések

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az Xgwm44 és az Xgdm61 markerek az *Ae. biuncialis* 2M és 3M kromoszómájára specifikusak, míg az *Ae. geniculata* 2M addíciós vonal esetében nem keletkezett PCR termék, tehát polimorfizmus jelent meg az búza-*Ae. biuncialis* és a búza *Ae. geniculata* addíciós vonal között. A polimorfizmus okozója valószínűleg az *Ae. biuncialis*

és az *Ae. geniculata* genetikai variabilitása, de nem kizárt, hogy a búza-*Ae. biuncialis* és búza-*Ae. geniculata* addíciós vonalak előállításához használt búza genotípusok különbözősége (Chinese Spring és Martonvásári9 kr1) is befolyásolhatja az eredményt. Kísérleteink során az *Ae. biuncialis* és az *Ae. geniculata* között polimorfizmust figyeltünk meg az Xbarc 184 markerrel (1. ábra), amely alátámasztja az *Aegilops* fajok egyes genomjainak nagy genetikai variabilitását, változatosságát.

A fenti eredmény is mutatja az SSR markerek nagy polimorfizmusát, amely lehetővé teszi a különböző fajok rokonsági viszonyinak elemzését. Az *Aegilops* fajok kromoszómáira specifikus SSR markerek kiválogatása lehetővé teszi az ezekkel a fajokkal létrehozott introgressziós vonalakban az U és M genom kromoszóma fragmentumok pontosabb nyomon követését.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat a PD75450 sz. OTKA pályázat és az AGRISAFE 203288 sz. EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázat támogatta.

A szerzők hálásak Bucsi Istvánné és Havasi Józsefné technikai segítségéért. Külön köszönet Dr. B. Friebe-nek, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a búza-*Ae. geniculata* addíciós vonalakat.

Irodalom

- Friebe, B., Tuleen, N., Gill, B. S. (1999): Development and identification of a set of *Triticum aestivum*-*Aegilops geniculata* chromosome addition lines. *Genome*, **42**, 374-380.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., Sutka, J. (1996): Transfer of the recessive crossability allele *kr1* from Chinese Spring into winter wheat variety Martonvásári 9. *Euphytica*, **90**, 301-305.
- 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. *Functional Plant Biology*, **31**, 1149-1159.
- Nagy, E. D., Christoph, E., Molnár-Láng, M., Lelley, T. (2003): Genetic mapping of sequence-specific PCR-based markers on the short arm of the 1BL.1RS wheat rye translocation. *Euphytica*, **132**, 243-250.
- Pestsova, E., Ganal, M. W., Röder, M. S. (2000): Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, **43**, 689-697.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., Ganal, M. W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics*, **149**, 2007-2023.
- Schneider, A., Linc, G., Molnár, I., Molnár-Láng, M. (2005): Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of five derived wheat/*Aegilops biuncialis* disomic addition lines. *Genome*, **48**, 1070-1082.
- Schneider, A., Molnár, I., Molnár-Láng, M. (2008): Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, **163**, 1-19.
- Somers, D. J., Isaac, P., Edwards, K. (2004): A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **109**, 1105-1114.