

## BÚZA és *T. TIMOPHEEVII* KROMOSZÓMA POLIFORMIZMUS VIZSGÁLATA MOLEKULÁRIS MARKEREKKEL

UHRIN ANDREA, LÁNG LÁSZLÓ, LÁNGNÉ MOLNÁR MÁRTA ÉS BEDŐ ZOLTÁN

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

A búza fontos agronómiai tulajdonságai, elsősorban a betegségekkel szembeni ellenállósága javítható a vele rokon fajokkal végzett keresztezésekből származó kromoszóma-transzlokációk beépítésével. A *Triticum timopheevii* ssp. *timopheevii* értékes rezisztenciaforrás több, a búzát gyakran megfertőző gombabetegség ellen. Vizsgálataink célja, hogy polimorf markereket találjunk a búza és a *T. timopheevii* B és G kromoszómái között, hogy azok segítségével a *T. timopheevii* kromoszómák kimutathatóak legyenek búza háttérben. Kísérleteinkben a Martonvásáron előállított búza × *T. timopheevii* hibridből származó 6G/6B szubsztitúciós vonalat (AMP12), két szülői búzafajtát (Mv14, MIR808), illetve egy *Triticum timopheevii* ssp. *timopheevii* genotípust vizsgáltunk 40, a búza 6B kromoszómájára térképezett SSR markerrel. 40 tesztelt SSR marker közül 10 mutatott egyértelmű különbséget a 6G és 6B kromoszóma között. Nyolc marker nem mutatott polimorfizmust a 6G/6B szubsztitúciós vonalak és a búzafajták között, három marker pedig három különböző terméket eredményezett a búzafajták, a 6G/6B szubsztitúciós vonal és a *T. timopheevii* között.

**Kulcsszavak:** *T. timopheevii*, SSR marker, 6G/6B szubsztitúció

## DETECTING CHROMOSOME POLYMORPHISM BETWEEN *T. AESTIVUM* AND *T. TIMOPHEEVII* GENOTYPES USING MICROSATELLITE MARKERS

A. UHRIN, L. LÁNG, M. MOLNÁR-LÁNG, Z. BEDŐ

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

Important agronomic traits of wheat, such as disease resistance, can be enhanced by incorporating chromosome translocations from species related to wheat via crossing. *Triticum timopheevii* ssp. *timopheevii* is a valuable source of resistance against several fungal diseases that regularly attack wheat. The aim of this analysis was to find markers that exhibited polymorphism between the wheat chromosome 6B and the *T. timopheevii* chromosome 6G. In this study, a 6G/6B substitution line (AMP12), developed in Martonvásár from the wheat × *T. timopheevii* hybrid, and the parental wheat cultivars Mv14 and MIR808 were analysed together with a *Triticum timopheevii* ssp. *timopheevii* genotype stored in the Martonvásár gene bank, using microsatellite markers mapped to the wheat chromosome 6B. Of the 40 SSR markers tested, 10 exhibited differences between chromosomes 6G and 6B. Eight markers did not show polymorphism between the substitution lines and the wheat cultivars. Three markers exhibited bands with three different sizes between the wheat cultivars, the substitution lines and the genotype *T. timopheevii*.

**Key words:** *T. timopheevii*, SSR marker, 6G/6B substitution

## Bevezetés

A búzával keresztezhető növényfajok hasznos forrásai lehetnek olyan tulajdonságoknak, amelyek jelentősen növelik a búza alkalmazkodó képességét, vagy felhasználhatóságát. E jellemzők között különös figyelmet érdemel a kártevőkkel-és kórokozókkal valamint abiotikus tényezőkkel szembeni ellenállóképesség. A *Triticum timopheevii* (Zhuk.) ssp. *timopheevii* tetraploid, A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>GG genomképlettel rendelkező vad *Triticum*-faj, melynek különböző vonalaival már számos búza-*T. timopheevii* fajhibridet hoztak létre (Belea, 1986, Järve *et al.*, 2002). Lisztje jó sütőipari minőséggel rendelkezik, fehérjetartalma magas (Zhukovsky, 1971, Tavrín, 1963). Belea (1961) Martonvásáron búza x *T. timopheevii* hibrideket állított elő, melyekből később 6G/6B szubsztitúciós vonalakat hoztak létre.

Badaeva *et al.* (1991) vizsgálatai szerint a *T. timopheevii* és a *T. aestivum* közötti keresztezésekben az A<sup>1</sup> kromoszómák az A kromoszómákat, a G kromoszómák pedig B homeológ párjukat helyettesítik. A különböző búzagenotípusokkal végzett *T. timopheevii* keresztezésekben a 2B/2G, 6B/6G és 2A/2A<sup>1</sup> szubsztitúciók fordulnak elő a leggyakrabban.

A C-sávzással kapott eredmények alapján ezekben a keresztezésekben az egyes kromoszómaszegmensek transzlokációja helyett inkább a teljes kromoszóma szubsztitúció a gyakoribb (Badaeva *et al.* 1991). Jarve *et al.* (2000) RFLP és mikroszatellit analízissel kimutatták, hogy az előzetes, Badaeva *et al.* által végzett C-sávzás eredménye ellenére nem teljes 6B/6G szubsztitúció, hanem 6G transzlokáció található egy olyan genotípusban, melyben később azonosították a lisztharmat rezisztenciát okozó domináns *Pm27* gént.

A *T. timopheevii* ssp. *timopheevii* értékes rezisztenciaforrás a szároztsda (*Puccinia graminis*), levélroztsda (*P. triticina*), lisztharmat (*Blumeria graminis*) és különféle üszöggombafajok ellen (McIntosh és Gyárfás, 1971). Allard és Shands (1954) kiemelkedő szároztsda ellenállósággal bíró tavaszi búza törzseket állított elő a *T. timopheevii*-vel való keresztezésekben. McIntosh és Gyárfás (1971) három, *T. timopheevii*-ből származó szároztsda rezisztenciagént azonosított (*Sr36*, *Sr37* és egy nem megnevezett harmadikat). Az *Sr36* génnel kapcsolatosan öröklődik a *Pm6* lisztharmat-rezisztenciagén. Újabb, a búza 7A hosszú karjára transzlokálódott domináns lisztharmat rezisztenciagént (*Pm37*) azonosították a *T. timopheevii* ssp. *armeniicum*-ból Perugini *et al.* (2008).

A Belea (1961) által előállított hibridek 6G/6B szubsztitúciós utódai (martonvásári nyilvántartásunkban az AMP12 néven szerepel) rezisztensnek bizonyultak a levélroztsda és a lisztharmat fertőzések ellen.

Munkánk célja, hogy e búza x *T. timopheevii* hibridek utódaiban a *T. timopheevii* kromoszómákat nyomon követhessük a 6G kromoszómára specifikus molekuláris markerek segítségével.

## Anyag és módszer

A Martonvásárott előállított 6G/6B szubsztitúciós vonalat (AMP12) vizsgáltuk, ami a Fleischmann 481/*Triticum timopheevii* amfiploid (Belea, 1961) Mironovszkaja 808 és Mv14 búzafajtákkal visszakeresztett 42 kromoszómaszámú, lisztharmattal és levélrozsával szemben rezisztens utóda. Ez a vonal a búza 6B helyett a *T. timopheevii* 6G kromoszómáját hordozza (Lángné Molnár *et al.*, 1996). Molekuláris markerekkel végzett tesztheink további növényi anyagai a Mv14 és Mironovszkaja 808 búzafajták, valamint a martonvásári génbankban tárolt *Triticum timopheevii* ssp. *timopheevii* var. *timopheevi* genotípus. Ezek a növények a szülők genotípusát képviselték.

A vizsgálatban használt molekuláris markerek Somers *et al.* (2004) valamint Roder *et al.* (1998) által térképezett wmc, gwm, barc, cfd és gdm markerek voltak.

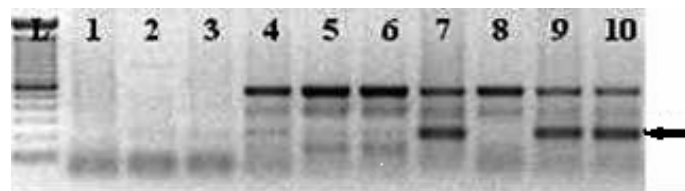
Összesen 40, a búza 6B kromoszómájára térképezett mikroszatellit markert teszteltünk. 14 napos növényekből izoláltunk DNS-t a DNeasy® Plant Mini Kittel (Qiagen). Felhasználásukig – 20°C-on tároltuk a mintákat. A PCR reakciókat a Veriti 96 Well Thermal Cycler-ben (Applied Biosystems) végeztük. A PCR reakciókban használt master mix végtérfogata 25 µl volt, amely 2 µl 20 ng/µl koncentrációjú DNS oldatot, 5 µl 10x Mg-nélküli PCR puffert, 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> oldatot, 0,4 µl 2,5 mM dNTP-t, 0,3 µl mindkét 0,2 µg/µl primerből, 14,4 µl steril MilliQ víz és 0,1 µl 5 U/µl Taq DNA polimerázt (GoTaq®) tartalmazott. A felszaporított termékeket 2,2 %-os, etídium-bromiddal festett agaróz gélen választottuk el. A gélen futtatott, elválasztott termékek mintázatát Bio-Rad Fluor – S<sup>TM</sup> MultiImager szkennelőről rögzítettük. A PCR reakciók a következő ciklusokból álltak: 94°C-3 min, 45 ciklus (94°C-1 min, 54-61.5°C-1 min, 72°C-1 min) és 72°C-10 min. A cfd1 és cfd13 marker esetében a ciklusok a következők voltak: 94°C-5 min, 30 ciklus (94°C-0.30 min, 60°C-0.30 min, 72°C-0.3 min) és 72°C-10 min.

## Eredmények és következtetések

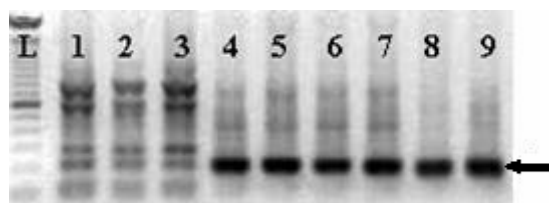
A búza 6B kromoszómájának rövid karjára, hosszú karjára és centroméra régiójára térképezett markereket teszteltünk. Vizsgálataink eredményei szerint a MIR808 és az Mv14 között egyetlen esetben sem találtunk különbséget. Negyven tesztelt marker közül tíz mutatott polimorfizmust a 6G és 6B kromoszómák között. Ezek az SSR markerek a következők: barc198, barc24, gdm113, gwm132, gwm219, gwm508, gwm626, wmc104, wmc539, wmc417. (1. ábra).

A markerek közül nyolc (barc127, barc76, wmc756, wmc397, wmc494, wmc726, wmc748, wmc79) nem mutatott specifikus különbséget a búzafajták és a 6G/6B szubsztitúciót hordozó vonal (AMP12) között, viszont eltérő méretű terméket adtak (vagy nem volt termék) a *T. timopheevii* mintákban (2. ábra). Polimorfizmust mutattak tehát a *T. timopheevii* illetve a búzafajták és a búza háttérű szubsztitúciós vonalak között.

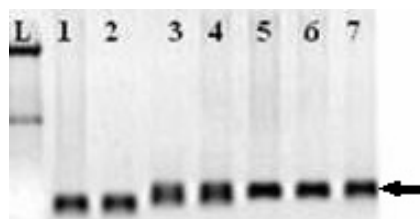
Három SSR marker (barc146, gwm191, gwm518) három különböző méretű terméket eredményezett a két búzafajtának, a 6G/6B szubsztitúciót hordozó vonalnak (AMP12) és a *T. timopheevii*-nek megfelelően (3. ábra). A többi SSR marker által felszaporított termékek között vagy nem volt különbség agaróz gélen vagy nem ment végbe a reakció.



1. ábra. A barc539 markerrel kapott mintázat. **1, 2, 3-***T. timopheevii*; **4, 5, 6, 8-**AMP12; **7-**„false” AMP12; **9-**Mv14; **10-**MIR808. A nyíl a 220bp méretű, búza 6B kromoszómára specifikus jelet jelöli.



2. ábra. A wmc419 markerrel kapott mintázat. **1, 2, 3-***T. timopheevii*, **4, 5, 6-**AMP12; **7-**„false”AMP12; **8-**Mv14; **9-**MIR808. A nyíl a 200bp méretű, búza 6B kromoszómára specifikus jelet mutatja. A „false”AMP12 és az AMP12 minták esetében a termék szintén 200bp nagyságú.



3. ábra. A gwm518 markerrel kapott mintázat. **1, 2-***T. timopheevi*; **3, 4-**AMP12; **5-**„false”AMP12; **6-**Mv14; **7-**MIR808. A búzafajták és a „false”AMP12 mintákban 200bp, az AMP12 mintákban kettős jelet (180+200bp), a *T. timopheevii* mintákban pedig 100bp nagyságú terméket ad.

A minták egyike, a „false” AMP12 minden egyes tesztnél ugyanazt az eredményt adta, mint az Mv14 és a MIR808, tehát e növényből feltehetőleg eliminálódott a 6G kromoszóma. A búzafajták és a 6G/6B szubsztitúciós vonalak között különbséget nem mutató, a búza-szubsztitúciós vonal-*T. timopheevii* között három különböző jelet adó markereket további vizsgálatoknak vetjük alá.

Részletesebb kiértékelés, elválasztás érdekében az eddig agaróz gélen szétválasztott, polimorfizmust nem mutató termékeket poliakril-amid gélen vizsgáljuk tovább.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatásokat az OMFB 00515/2007 valamint az AGRISAFE 203288 sz. EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázat támogatta.

### Irodalom

- Allard, W., Shands, R.G. (1954): Inheritance of resistance to stem rust and powdery mildew in cytologically stable spring wheats derived from *Triticum timopheevii*. *Phytopathology*, 44, 266-274.
- Badaeva, E.D., Budashkina, E.B., Badaev, N.S., Kalinina, N.P., Shkutina, F.M. (1991): General features of chromosome substitutions in *Triticum aestivum* x *Triticum timopheevii* hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, 82, 227-232.
- Belea, A. (1961): Cercetari privind amfidiploidul *Triticum aestivum* x *Triticum timopheevii* in F2 si in generatiile urmatoare. *Probl. Agric.* 8:1-21.
- Belea, A. (1986): Faj-és nemzetségkeresztezések a növényvilágban. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest, pp 235.
- Järve, K., Peusha, H.O., Tsybalova, J., Tamm, S., Devos, K.M., Enno, T.M. (2000): Chromosomal location of a *T. timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat. *Genome*, 43, 377-381.
- Järve, K., Jakobson, I., Enno, T. (2002): Tetraploid Wheat Species *Triticum timopheevii* and *Triticum militinae* in common wheat improvement. *Acta Agronomica Hungarica*, 50, pp.463-477.
- Lángné Molnár, M., Kőszegi, B., Linc, G., Sutka, J. (1996): Búza (*Triticum aestivum* L.)/ *Triticum timopheevii* Zhuk. addíció, szubsztitúció és búza/rozs transzlokáció kimutatása C-sávozással és *in situ* hibridizációval. *Növénytermelés*, 45: 237-245
- McIntosh, R.A., Gyárfás, J. (1971): *Triticum timopheevii* as a source of resistance to wheat stem rust. *Z. Pflanzenzücht*, 66, 240-248.
- Perugini, L.D., Murphy, J.P., Marshall, D., Brown-Guedira, G. (2008): *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theor. Appl. Genet.* 116, 417-425.
- Roder, M.S., Korzun V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, H.M., Leroy, P., Ganal M.W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Somers, D.J., Isaac, P., Edwards, K. (2004): A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat. (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 109:1105-1114.
- Tavrin, E.V. (1963): Comparative study of wheat species of Zanduri as a component for crossing with bread and durum wheat. Ph.D. thesis. Vavilov Institute of Plant Industry.
- Zhukovsky, P.M. (1971): Cultivated plants and their wild relatives. Systematics, geography, cytogenetics, immunity, origin and use. *Kolos*, Leningrad, 121 p.