

MOLEKULÁRIS MARKEREK FELHASZNÁLÁSA A BÚZA LEVÉLROZSDÁVAL SZEMBENI REZISZTENCIANEMESÍTÉSÉBEN

VIDA GYULA¹, GÁL MARIANN¹, WANG ZHULIN², BEDŐ ZOLTÁN¹ ÉS VEISZ OTTÓ¹

¹MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

² Northwest A&F University, Yangling, P.R.China

A jelenleg ismert 61 levélrozsdával, vagy e kórokozó patotípusaival szembeni rezisztenciát biztosító nagygen közül 27 molekuláris markerekkel is kimutatható. Markerszelekcióval 6 ismert és hatásos *Lr* gént (*Lr9*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr35* és *Lr37*) építünk be martonvásári eredetű fajtákba. A különböző kombinációknál jelenleg a BC₄-BC₆ generációt hoztuk létre. Az egy-egy rezisztenciagént hordozó, de már kiváló agronómiai tulajdonságú törzsek önmagukban nem, de rezisztenciaforrásként kiválóan hasznosíthatók. A rezisztenciagéneket egymással kombinálva (piramidálás) csökkenthető a betegség-ellenállóság korai letörésének kockázata. Az elmúlt években több kombinációt is létrehoztunk, melyek két-két rezisztenciagént hordoznak. A molekuláris markerek kiválóan hasznosíthatók rezisztenciagének azonosítására is ismeretlen genetikai háttérű búza genotípusokban. A martonvásári fajták szinte mindegyikének pedigréjében szerepel a 'Bezostaja 1' fajta, így feltételeztük, hogy az *Lr34* gén közülük több genotípusban is megtalálható. Molekuláris markerrel 12 búzafajtában mutattuk ki a gén jelenlétét.

Kulcsszavak: búza, levélrozsdá, rezisztenciagén, markerszelekció

USE OF MOLECULAR MARKERS IN BREEDING WHEAT FOR RESISTANCE AGAINST LEAF RUST

G. VIDA¹, M. GÁL¹, Z. L. WANG², Z. BEDŐ¹ AND O. VEISZ¹

¹Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

² Northwest A&F University, Yangling, P.R.China

Among the 61 designated major genes providing resistance against leaf rust or the various pathotypes of this pathogen, 27 can be detected using molecular markers. Marker-assisted selection is being used to incorporate 6 well characterised and efficient *Lr* genes (*Lr9*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr35* and *Lr37*) into varieties of Martonvásár origin. All these genes provide an excellent level of resistance to the pathogen. Various combinations are currently in generations BC₄-BC₆. The lines, each of which carries one resistance gene and has excellent agronomic traits, are not suitable for cultivation, but represent excellent sources of resistance. If the resistance genes are pyramided the risk that disease resistance will be rapidly overcome can be reduced. Molecular markers are also ideal for the identification of resistance genes in wheat genotypes with unknown genetic background. The variety 'Bezostaya 1' is present in the pedigree of almost all Martonvásár varieties, so it is assumed that many of them will contain the *Lr34* resistance gene. The presence of this gene has been demonstrated using molecular markers in 12 wheat varieties.

Key words: wheat, leaf rust, resistance gene, marker-assisted selection

Bevezetés

A rozsdagomba fajokkal szembeni rezisztencia javítása világszerte a búzanemesítés elsődleges feladatai közé sorolható. A búzát fertőző három faj (levél- szár- és sárgarozsda) közül Magyarországon jelenleg kétségkívül a levélrozsda okozza a legnagyobb kárt, fertőzésére szinte minden évben számíthatunk. A levélrozsda magyarországi körülmények között a termést közel 40%-kal is csökkentheti (*Barabás és Matuz* 1983).

A búzafajták levélrozsda ellenállóságát befolyásoló rezisztenciagének (*Lr* gének) közül eddig 61-et azonosítottak és lokalizáltak a búza kromoszómákon és ezek mellett több további feltételezett rezisztenciagén és mennyiségi tulajdonságot meghatározó kromoszómaszakasz (QTL) is teljes, vagy részleges védelmet biztosít a különböző rozsda patotípusokkal szemben (*McIntosh et al.* 2008). Egy mindössze egyetlen rezisztenciagént hordozó fajta rövid időn belül fogékonnyá válhat. Tartósabb rezisztencia alakítható ki, ha egy genotípusba több *Lr* gént építenek be, ún. génpiramidálással (*Nelson* 1978). A rezisztenciagének azonosítása hagyományosan ismert virulenciájú rozsda izolátumokkal történik (*Knott* 1989), azonban ez az eljárás rendkívül idő-, hely- és munkaigényes, továbbá a meghatározást lehetővé tevő gomba izolátum hiányában nem kivitelezhető. A rezisztenciagének azonosítása sok esetben kizárólag molekuláris markerekkel lehetséges (*Melchinger* 1990).

Az utóbbi másfél évtizedben a 27 a nemesítésben hatékonyan hasznosítható *Lr* gén markerét írták le (*McIntosh et al.* 2008).

A molekuláris markerek a rezisztencianemesítés két területén is alkalmazhatók: 1. ismert rezisztenciagén, vagy QTL beépítésének nyomon követésére elit genotípusokba; 2. rezisztenciagének azonosítására ismeretlen genetikai hátterű fajtákban és törzsekben. Búzanemesítési programunkban mindkét területen felhasználjuk a levélrozsda rezisztenciagénekkel kapcsolt molekuláris markereket. Markerekre alapozott visszakeresztezési programot indítottunk, melyben Magyarországon még jelenleg is hatékony *Lr* géneket építünk be martonvásári búzafajtákba, továbbá vizsgáltuk az *Lr34* rezisztenciagén elterjedtségét az intézetünkben nemesített és a nemesítési programban szülő partnerként használt búzafajtákban és törzsekben.

Anyag és módszer

Jó agronómiai és beltartalmi tulajdonságú, de a levélrozsda fogékony, illetve mérsékelt rezisztens martonvásári őszi búzafajtákat ('Mv Emma', 'Mv Madrigál', 'Mv Pálma' és 'Mv Magvas') kereszteztük az *Lr9*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr35* és *Lr37* gént hordozó rezisztenciaforrásokkal (*Lr9*: 'Transfer/Tc*6', *Lr24*: 'Thatcher'*6/Agent', *Lr25*: 'Thatcher'*6/'Transec', *Lr29*: 'Thatcher'*6/'Cs7D-Ag#11', *Lr35*: 'Thatcher'*6/'R.L.5711', *Lr37*: 'Renan'). Az F₁ növényeket visszakeresztettük a rekurrens szülővel. Az így előállított BC₁ és a későbbi BC nemzedékekben molekuláris markerszelekcióval (MAS) választottuk ki az *Lr* génhez kapcsolt markert tartalmazó növényeket, majd ezeket ismét visszakeresztettük a rekurrens szülővel. A keresztezéseket üvegházban és szántóföldön végeztük.

A beépítendő *Lr* gének kiválasztásánál a hatékonyságon kívül a rendelkezésre álló DNS marker meglétét vettük figyelembe. Olyan *Lr* géneket választottunk, melyekhez a szakirodalom szerint szorosan kapcsolt, megbízható PCR alapú markereket azonosítottak (*Lr9*: Schachermayr *et al.* 1994, Gupta *et al.* 2005, *Lr24*: Schachermayr *et al.* 1995, *Lr25* és *Lr29*: Procnier *et al.* 2004, *Lr35*: Gold *et al.* 2002, *Lr37*: Robert *et al.* 1999) Ezekkel az *Lr* génre hasadó BC-nemzedékekben molekuláris markerszelekciót végeztünk. A DNS izolálást a CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium-bromid) (Rogers és Bendich 1985) és a DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen®) módszerrel végeztük. Üvegházban a DNS izolálással párhuzamosan teszteltük a növények levélrozsda ellenállóságát.

Az *Lr34* gén kimutatása Lagudah *et al.* (2006) által közölt módszerrel, a csLV34F és csLV34R primerpárral történt. A PCR reakciót Thermal Cycler PCR System 9700 (AB Applied Biosystems) készüléssel végeztük. A felszaporított reakciótermékeket 2%-os sűrűségű, etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen választottuk el és Bio-Rad Fluor – S™ MultiImager géldokumentációs rendszerrel tettük láthatóvá.

Eredmények és következtetések

Markerszelekciós program

Szántóföldi, mesterségesen fertőzött kísérleteink eredményei alapján Magyarország területén még mindig több *Lr* gén van, amely teljes, vagy kiváló szintű védelmet biztosít a levélrozsdával szemben. Markerszelekcióval támogatott visszakeresztezési programot indítottunk, melynek során 4 martonvásári fajtába ('Mv Emma', 'Mv Madrigál', 'Mv Magvas' és 'Mv Pálma') kezdtük meg e gének beépítését. Elsőként az *Lr9*, *Lr24*, *Lr25* és az *Lr29* génekkel hoztunk létre kombinációkat, majd a programot kibővítettük két felnőttkori rezisztenciát kódoló *Lr* génnel (*Lr35* és *Lr37*). A kiválasztott *Lr* gének mindegyike jelenleg még kiváló szintű védelmet nyújt a hazai levélrozsda populációval szemben. A markerszelekciós programunkban szereplő négy martonvásári nemesítésű fajta jó agronómiai és beltartalmi tulajdonságú, levélrozsda rezisztenciájuk azonban javítható. A forrásként használt 'Thatcher' kanadai tavaszi fajtából származó közel-izogén törzsek agronómiai tulajdonságai nem megfelelőek magyarországi körülmények között, de a legtöbb esetben ezek jelentették az egyetlen elérhető rezisztenciagén forrást. Az *Lr37* gént hordozó 'Renan' francia fajta fenotípusa hasonló a magyar fajtákéhoz.

A PCR reakciók körülményeinek optimalizálása után valamennyi primer működött, így a hasadó nemzedékekben el tudtuk végezni a markerszelekciót. Eddig BC₂-BC₆ generációjú törzseket hoztunk létre a különböző kombinációkból (1. táblázat).

1. táblázat. Az *Lr* gének beépítését célzó visszakeresztezési programban létrehozott utódnemzedékek, Martonvásár, 2008

| Variety | Lr9 | Lr24 | Lr25 | Lr29 | Lr35 | Lr37 |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Mv Emma | BC ₆ | BC ₅ | BC ₅ | BC ₅ | BC ₃ | BC ₂ |
| Mv Madrigál | BC ₆ | BC ₆ | BC ₅ | BC ₅ | BC ₃ | BC ₃ |
| Mv Magvas | BC ₆ | BC ₅ | BC ₄ | BC ₅ | BC ₃ | BC ₃ |
| Mv Pálma | BC ₆ | BC ₄ | BC ₄ | BC ₅ | BC ₃ | BC ₃ |

A BC₅ és BC₆ generációjú törzsek agronómiai tulajdonságai már hasonlóak a martonvásári szülőpartneréhez. Mivel a vizsgálatok során használt markerek kapcsoltsága nem teljes a rezisztenciagénnel, az *Lr* gének markerszelekcióját minden esetben kiegészítettük fenotípusos vizsgálattal is. Kizárólag a levélrozsa ellenálló és egyben a megfelelő rezisztenciagént hordozó növényegyedeket használtuk fel a következő BC nemzedék létrehozására.

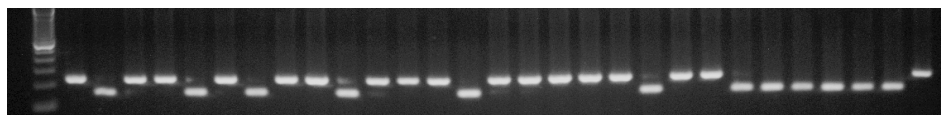
Mivel egy-egy *Lr* gén önmagában történő felhasználása magában hordozza a genetikai sebezhetőség veszélyét, megkezdtuk a különböző géneket hordozó törzsek kombinálását (piramidálás). E munkával célunk egyszerre több rezisztenciagént hordozó genotípusok létrehozása, melyek várhatóan az egy-egy gént hordozó törzseknél tartósabb levélrozsa-ellenállósággal rendelkeznek majd. Eddig a négy martonvásári fajtával összesen 11 piramidált génkombinációt hoztunk létre. A kombinációkból portok tenyészetet használva dihaploid programot indítottunk a génkombinációk stabilizálására. Eddig 3 DH törzs esetén azonosítottunk olyan növényegyedeket, melyek stabil kombinációban mindkét *Lr* gént hordozzák ('Mv Emma' *Lr9+Lr24*, 'Mv Pálma' *Lr9+Lr24* és 'Mv Pálma' *Lr9+Lr29*). Célunk e programmal a magyarországi körülményekhez alkalmazkodott, az eredeti donor fajtákénál sokkal jobb agronómiai tulajdonságú források létrehozása.

Az Lr34 gén kimutatása

A martonvásári búzafajták pedigre analízise alapján szinte minden fajta ősei között szerepel a 'Bezostaja 1', vagy ennek őse, a 'Bezostaja 4' fajta. Az eddig elismert 74 búzafajta közül 71 pedigréjében egyértelműen azonosíthatók ezen ősök, de a fennmaradó három pedigréjében is vannak olyan idegen eredetű törzsek, melyek származása pontosan nem ismert, így lehetséges, hogy ezek is visszavezethetők a két krasznodári származású fajtára. *McIntosh et al.* (1995) szerint a 'Bezostaja 1' hordozza az *Lr34* gént, így valószínűsíthető volt, hogy több martonvásári fajtában is jelen van. Az *Lr34* rezisztenciagén azonosítását a csLV34F és csLV34R primerpárral végeztük (*Lagudah et al.* 2006). Az elismert búzafajtáink mellett több saját nemesítési törzs és idegen eredetű keresztezési partnert is teszteltünk (1. ábra).

A 226 vizsgált búzafajta és nemesítési törzs közül 64-ben található meg az *Lr34* rezisztenciagén (28.3%). A 128 martonvásári eredetű búzafajta és nemesítési törzs közül 34-ben (26.6%) mutattuk ki az *Lr34* jelenlétét, ugyanakkor a 73 elismert fajtából mindössze 12-ben ('Martonvásári 3', 'Martonvásári 13', 'Martonvásári 17', 'Mv Emese', 'Mv Garmada', 'Mv Gorsium', 'Mv Laura', 'Mv Mambó', 'Mv Pálma', 'Mv Palotás', 'Mv Táltos' és 'Mv Vilma') azonosítottuk a gént molekuláris markerrel.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29



M. 100 bp DNS létra; 1. Mv Magdaléna; 2. Mv Laura; 3. Mv Zelma; 4. Tommi; 5. Ukrainka; 6. Ellvis; 7. Mv12-04; 8. Mv233-05; 9. Mv Vekni; 10. Mv Táltos; 11. Mv Amanda; 12. Tiger; 13. Mv08-08; 14. Mv222-07; 15. Maximus; 16. Mv320-07; 17. Ravenna; 18. CF99007; 19. Mv21-07; 20. LUT53656; 21. BR02-028; 22. Atrium; 23. Jiana; 24. Mv Gorsium; 25. Mv09-04; 26. GK Kapos; 27. Litera; 28. pozitív kontroll - Frontana; 29. negatív kontroll - Thatcher.

1. ábra. Az Lr34 gén kimutatása búza genotípusokban. Martonvásár, 2008

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a BioExploit EU FP6 (FOOD-CT-2005-513959), a 'Plant Resource' NAP-BIO_06 és az AGRISAFE 203288 sz. EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázat támogatta.

Irodalom

- Barabás Z., Matuz J. (1983): A levélrozsdá és a lisztharman epidémia, illetve különféle rezisztencia típusok befolyása őszi búza genotípusok termésére. *Növénytermelés* **32**, 193-207.
- Gold, J., Harder, D., Townley-Smith, F. et al (2002): Development of molecular marker for rust resistance genes Sr39 and Lr35 in wheat breeding lines. <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol2/issue1/full/1/index.html>
- Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S. et al (2005) Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, Lr9, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome* **48**, 823-830.
- Knott, D.R. (1989): The wheat rusts: breeding for resistance. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg
- Lagudah, E.S., McFadden, H., Singh, R.P. et al (2006): Molecular genetic characterization of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* **114**, 21-30.
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat Rusts - An atlas of resistance genes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
- McIntosh, R.A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., et al (2008) Catalogue of gene symbols for wheat. In: Komugi - Integrated Wheat Science Database. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
- Melchinger, A.E. (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* **104**, 1-19.
- Nelson, R.R. (1978): Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Ann Rev Phytopathol* **16**, 359-378.
- Procnier, D. (2007): Disease resistance. Leaf Rust Resistance Lr29 - Lr25. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr29/index.htm>
- Robert O, Abelard C, Dedryver F (1999) Identification of molecular markers for the detection the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat. *Mol Breeding* **5**, 167-175.
- Schachermayr, G., Siedler, H., Gale, D.M. et al. (1994) Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor Appl Genet* **88**, 110-115.
- Schachermayr, G.M., Messmer, M.M., Feuillet, C. et al. (1995): Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene Lr24 in wheat. *Theor Appl Genet* **90**, 982-990.