

Gabonafélék hidegadaptálódását befolyásoló gének térképezése és molekuláris markerezése

Doktori értekezés Tóth Balázs

> *Gödöllő* 2003.

Doktori iskola:	Növénytudományi Doktori Iskola	
Vezetője:	Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár, MTA doktora SZIE, Növényvédelem Tanszék	
Tudományága:	Yága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok	
Program:	Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel	
Programvezető:	Dr. Heszky László tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA levelező tagja SZIE, Genetika és Növénynemesítés Tanszék	
Témavezető:	Dr. Galiba Gábor tudományos osztályvezető, az MTA doktora	

Dr. Heszky László programvezető

Dr. Galiba Gábor témavezető

.....

Tartalomjegyzék

TARTALO	DMJEGYZÉK	. 1
RÖVIDÍT	ÉSEK JEGYZÉKE	. 5
1. B EV	EZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	. 7
1.1.	Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5	B
kromo	szómán	. 7
1.2.	PCR alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok	
szeleke	ciójára árpa 5H kromoszómán	. 8
2. IRO	DALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1.	A búza és az árpa fagyállósága és vernalizációs igénye	11
2.1.1	I. A vernalizációs igényt és koraiságot meghatározó gének búzában	11
2.1.2	2. A búza fagytűrésének genetikája	12
2.1.3	<i>B. Vernalizációs igényért felelős gének árpában</i>	14
2.1.4	4. Az árpa fagytűréséért felelős fő régiók	15
2.2.	Molekuláris markerek felhasználása szelekcióra	16
2.3.	A búza molekuláris analízise	17
2.4.	Térképezési populációk	19
2.5.	Genetikai markerek	20
2.5.1	1. <i>RFLP</i>	21
2.5.2	2. AFLP	22
2.5.3	<i>RAPD</i>	22
2.5.4	4. Mikroszatellit (SSR) markerek	23
2.6.	Kapcsoltsági térkép	24
2.7.	QTL analízis	26
3. ANY	AGOK ÉS MÓDSZEREK	29
3.1.	Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5	B
kromo	szómán	29
3.1.1	I. Térképezési populációk	29
3.1.2	2. Virágzási idő meghatározása	29
3.1.3	<i>B. Hidegedzés és a fagyállóság tesztelése</i>	30
3.1.4	4. DNS izolálás	30
3.1.5	5. Mikroszatellit analízis	31
3.1.0	6. Kapcsoltsági térkép készítése és QTL analízis	32
3.2.	PCR-alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok	
szeleke	ciójára árpa 5H kromoszómán	32
3.2.1	1. Növényi anyag	32
3.2.2	2. Fenotipizálás (F_{ν}/F_m paraméter meghatározása)	33
3.2.3	3. DNS izolálás	33
3.2.4	4. Primer tervezés és PCR analízis	34
3.2.5	5. RAPD analízis	35

	3.2.6.	PCR termékek genetikai térképezése	. 35
4.	Eredmé	NYEK	. 37
4	4.1. Vir	ágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza :	5B
ŀ	kromoszói	nán	. 37
	4.1.1.	Vrn-B1 térképezése	. 37
	4.1.2.	Koraisági lókuszok térképezése	. 39
	4.1.3.	Fr-B1 térképezése	. 40
4	I.2. PC	R alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok	
S	zelekciójá	ira árpa 5H kromoszómán	. 42
	4.2.1.	Fenotipizálás	. 42
	4.2.2.	STS markerek kifejlesztése és tesztelése	. 42
	4.2.3.	Az OPA17 RAPD marker tesztelése	. 46
	4.2.4.	A polimorf markerek térképezése	. 46
4	I.3. Új∶	tudományos eredmények	. 48
5.	KÖVETK	EZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	. 51
5	5.1. Vir	ágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 🗄	5B
ŀ	kromoszói	nán	. 51
	5.1.1.	A kapott adatok manuális kiértékelése: színtérképezés	. 53
5	5.2. PC	R alapú markerek kifejlesztése, tesztelése, és térképezése fagyti	űrő
Ę	genotípuso	ok szelekciójára árpa 5H kromoszómán	. 56
	5.2.1.	STS markerek kifejlesztése RFLP markerekből	. 56
	5.2.2.	Egyéb szelekcióra használható PCR-alapú markerek: OPA17 RA	PD
	marker		. 58
6.	Összefo	DGLALÁS	. 61
SUI	MMARY		. 63
IRC	DALOMJE	GYZÉK	. 65
FÜ	GGELÉK		. 77
Kö	SZÖNETNY	YILVÁNÍTÁS	. 84

Rövidítések jegyzéke

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ANOVA	Analysis of Variance
bp	Bázispár
BC	Backcross
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CBF	Cold Binding Factor
cDNS	komplementer (complementary) DNS
cM	centimorgan
CNN	Cheyenne
COR	Cold Regulated
CS	Chinese Spring
DH	Doubled Haploid
Eps	earliness per se
LOD	Likelihood of Odds
LR	Likelihood Ratio
MAS	Marker Assisted Selection
QTL	Quantitative Trait Loci
PCR	Polymerase Chain Reaction
PSII	Photosystem II (második fotokémiai rendszer)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIL	Recombinant Inbred Line
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
STS	Sequence Tagged Site
TSP	Triticum spelta

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A gabonafélék télállóságának növelése az új fajták létrehozásának egyik fontos szempontja, mivel a hazánkban termesztett gabonák nagy része őszi vetésű, és a termésbiztonság érdekében túl kell élniük a telet. A télállóság folyamatainak megértését nagyban segíthetik az egyre részletesebb genetikai és fizikai térképek, melyek segítségével a télállóságért felelős gének helye pontosan meghatározható a genomban. Így lehetővé válik ezeknek a géneknek a klónozása, illetve génspecifikus PCR-alapú markerek gyakorlati felhasználása markerek segítségével történő szelekcióra (marker assisted selection, MAS).

A dolgozat két fejezete térképezési munkákat és fagytűrő genotípusok gyors szelekciójára alkalmas markerek vizsgálatát mutatja be búzában és árpában.

1.1. Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

Hazánk legfontosabb élelmiszeripari növénye a kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.). Vetésterülete a kukoricáéval vetekszik, 2001-ban 1,198 millió hektáron, míg 2002-ben 1,106 ezer hektáron termesztették (KSH adatok). A klimatikus viszonyok miatt Magyarországon szinte kizárólag az őszi búzát termesztik, mert ez mintegy 30 – 40 %-kal nagyobb termést eredményez, mint a tavaszi búza.

Az őszi vetésű növényeknek egy nagyon kritikus periódust kell átvészelniük: a telet. A tél során több környezeti tényezővel is meg kell birkóznia a növénynek. A télálló növényeknek nemcsak az alacsony hőmérsékletet kell károsodás nélkül túlélniük, hanem a hőingadozások miatti talajfagyást és olvadást, az ezzel járó talajmozgást is. A talaj fagyása, olvadása a gyökérzet mechanikai károsodását okozhatja, ami a növény vízellátásában komoly problémákat okozhat. Szárító szelek károsíthatnak, a hó tetején kialakuló jégréteg a levegőtől elzárhatja a növényeket, oxigénhiány léphet fel, továbbá jelentősen megnövekedhet a páratartalom, és a hópenész (*Microdochium niveale*) is megjelenhet egy hosszú,

csapadékos tél során. A jó termés érdekében a búzanemesítés egyik fontos feladata tehát a télálló fajták előállítása. A télállóság legjelentősebb komponensei közé tartozik a fagyállóság, vagy más néven fagytűrés, és a vernalizációra való érzékenység. A fagyállóság kialakulásához a növényeknek edződniük kell. E folyamat alatt olyan adaptív biokémiai, élettani változások történnek, melyek felkészítik a növényt a fagy eltűrésére. Természetes körülmények között az edződés ősszel, csökkenő hőmérséklet és rövidülő nappalhossz mellett megy végbe. A vernalizáció szintén ősszel játszódik le, amikor a növény huzamosabb ideig alacsony hőmérsékleten van. Ez a periódus elengedhetetlen az őszi gabonafélék tavaszi virágzásához. Ezek a folyamatok azonban modellezhetők, és így lehetőség van mesterséges viszonyok között is az edződés, fagyás és vernalizáció során lejátszódó folyamatok tanulmányozására. A 80-as, 90-es évek kutatásainak eredményeképpen kiderült, hogy bár a fagyállóság poligénes tulajdonság, néhány génnek meghatározó a jelentősége. Így például a búza esetében az 5-ös homeológ csoport kromoszómáin levő gének bizonyultak a fagytűrés meghatározásában a legfontosabbnak. Martonvásári kollégáim a Cambridgelaboratóriummal (John Innes Centre, Norwich, Egyesült Királyság) közösen térképezték az 5A és 5D kromoszómákon levő fagyállóságot és vernalizációs igényt meghatározó géneket.

Vizsgálataink célja ezért a búza 5B kromoszómáján elhelyezkedő vernalizációs igényért felelős-, koraisági-, és fagytűrési gének genetikai térképezése volt.

1.2. PCR alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

A meglevő térképezési adatok gyakorlati felhasználásának az egyik módja lehet az egyes jellegekhez kapcsolt markerek alkalmazása az adott tulajdonságra történő szelekcióra. A molekuláris markerek alkalmazása a növénynemesítésben nemcsak gyorsabb és olcsóbb, mint a hagyományos eljárások, de bizonyos esetekben az egyetlen hatékony módszer a szelekcióra. Dél-Európában több év is

8

eltelhet komolyabb fagyok nélkül, azonban rendszertelen időközönként előfordulnak -10° C - -15° C-os fagyok is. Egy nemesítési programban tartós fagy esetén (-10° C alatt) az abban az évben elvetett teljes árpa populáció elveszhet, különösen, ha tavaszi/őszi keresztezésből származnak, mivel hagyományos úton nem lehet a fagytűrő genotípusokat kiszelektálni. Ilyen esetekben szükséges lehet a molekuláris markerek alkalmazása a fagytűrő genotípusok szelekciójára. Továbbá, tavaszi jellegű, fagytűrő gabonák szelektálására is alkalmas a molekuláris markerek segítségével végzett szelekció.

A 90-es években a gabonafélék stressztűrését, így a fagyállóságát meghatározó gének pozícióját RFLP térképezéssel határozták meg. Az RFLP azonban kevésbé alkalmas szelekcióra, mivel nagy mennyiségú, tiszta DNS-sel végezhető, és viszonylag nagy a költség- és munkaigénye. Ezért határoztuk el fagytűrésért felelős régiókra térképezett RFLP próbák PCR-alapú markerré való átalakítását, mivel kis munkaigénye, alacsony költségei, nagy áteresztőképessége miatt alkalmasak nagy mintaszámú nemesítési populáció gyors szelektálására.

Kísérleteinkben a gabonafélék 5-ös homeológ kromoszómáinak a fagytűrésért felelős régióira térképezett RFLP markerek PCR-alapú markerekké átalakítását, illetve egyéb – fagytűrő genotípusok szelekciójára használható – PCR alapú markerek árpában történő tesztelését és térképezését tűztük ki célul.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A búza és az árpa fagyállósága és vernalizációs igénye

A mérsékeltövi gabonafélék jellegzetessége a hidegedződésre való képesség, melynek során alacsony, de fagypont feletti hőmérsékleten nevelve, képessé válnak nagyobb fagyok túlélésére is. A természetben is ez játszódik le ősszel. Az őszi típusú gabonafélék nemcsak a megnövekedett fagytűrést érik el az alacsony hőmérsékleten történő edződésük során, hanem képessé válnak a következő tavasszal virágot hozni, és magot kötni, azaz megtörténik a vernalizációjuk. A tavaszi jellegű gabonafélék képesek a virágzásra vernalizáció nélkül is, míg az őszi jellegűek virágzásához vernalizációra van szükség.

2.1.1. A vernalizációs igényt és koraiságot meghatározó gének búzában

A búza virágzásának ideje három különböző géncsalád kontrollja alatt áll: vernalizációs igényt meghatározó gének, a fotóperiódus érzékenységet befolyásoló gének és a koraisági gének (Law és mtsai. 1991). Azok a gének, melyek a vernalizációra való érzékenységet (Vrn) befolyásolják, határozzák meg egy adott fajta őszi, illetve tavaszi jellegét. Az őszi búzáknak a virágzás (kalászolás) érdekében szükségük van egy hosszú 6-10 hetes hideg periódusra, melynek a hőmérséklete 0°C és 8°C között ingadozhat. A tavaszi búzáknak nincs szükségük vernalizációra, vagy csak gyengén reagálnak rá (például hamarabb virágoznak). A tavaszi jelleg általában domináns. A tavaszi/őszi jelleget öt lókusz határozza meg és közülük négynek kromoszómális lokalizációja is ismert (Law és mtsai. 1976, Law és mtsai 1991). A génlókuszok neve 1997-ben megváltozott: Vrn-A1(5Akorábban Vrn1), Vrn-D1(5D- korábban Vrn3), Vrn-B1(5B- korábban Vrn2 vagy 4) és Vrn-B4(7B- korábban Vrn5). Az európai búzafajták esetében, de talán a világ más nagyobb búzatermesztő-régióiban is, a Vrn-A1-en elhelyezkedő allélok dominánsak a vernalizációs igény csökkentésében (Snape és mtsai 1985). Különösen nagyhatású allélt tartalmaz egy Triticum spelta származék 5A kromoszómája. Ez az allél őszi búzába helyettesítve átváltoztatta annak jellegét tavaszivá (Law és mtsai. 1981). Emellett, a *Vrn-D1* is fontos néhány kínai fajtában, így a Chinese Springben is, bár hatása kissé gyengébb a *Vrn-A1*-nél. A *Vrn* gének működésének megértését segítheti, hogy Yan és mtsai (2003) sikeresen klónozták *Triticum monococcum*-ból az 5A kromoszómán elhelyezkedő vernalizációs igényért felelős gént, amely nagy valószínűséggel a MADS-box gének csoportjába tartozik.

Sarma és munkatársai (2000) deléciós vonalak segítségével térképeztek virágzási időt befolyásoló géneket a búza 5B kromoszómán, és két lehetséges lókuszt találtak. Az egyik disztálisan helyezkedett el, és megfelelt a feltételezett *Vrn-B1*-nek, míg a másik egy feltételezett koraisági (*Eps*) lókusz volt, közel a centromérához.

Bizonyos esetekben teljesen vernalizált és 24 órás nappalhosszúságon nevelt növények között is lehet eltérés a virágzási időben. Ezt az eltérést a koraisági lókuszok okozzák, melyek a környezettől függetlenek. Napjainkig csak kevés *Eps* lókuszt térképeztek búzában, a 2-es homeológ csoport kromoszómáin, és a 3A kromoszóma rövid karján (Shah és mtsai. 1999). Árpában, kis felbontású térképeken számos koraisági lókusz meglétét feltételezték (Laurie és mtsai. 1995), és figyelembe véve a búza árpához való nagyfokú hasonlóságát, több *Eps* lókusz meglétét, és hozzávetőleges pozícióját is megjósolták búzában (Snape és mtsai. 2001).

2.1.2. A búza fagytűrésének genetikája

A fagyállóságot kontrolláló gének hatásának és kölcsönhatásának a jellegét búza diallél keresztezésekkel határozták meg (Puchkov és Zhirov 1978, Parodi és mtsai. 1983, Sutka 1981, 1984). A kombinálódó képesség variancia analízise arról tanúskodott, hogy mind az általános (GCA), mind a speciális (SCA) kombinálódó képesség varianciája szignifikáns. A nagy GCA:SCA arány alapján azt a következtetést vonták le, hogy az additív génhatások túlsúlyban vannak a dominanciához és az episztázishoz viszonyítva. Az általános reciprokhatás a reciprokkeresztezések között nem volt szignifikáns. Ez arra utal, hogy a fagyállóság öröklődésében az extrakromoszómális (citoplazmás) géneknek nincs szerepük, vagy az csak jelentéktelen. A diallél elemzések eredményéből az következett, hogy a fagyállóság poligénes öröklődésű. Monoszómás és kromoszóma szubsztitúciós elemzésekkel sikerült azonosítani azokat a kromoszómákat, melyek fagyállóságot befolyásoló géneket hordoznak (Puchkov és Zhirov 1978, Sutka 1981, Rigin és Barashkova 1984, Roberts 1986). A CS(Cheyenne) kromoszóma szubsztitúciós sorozattal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a kiváló fagyállóságú Cheyenne őszi búza 5A, 5B, 5D, 2B, 4B, 4D és 7A kromoszómái növelik az érzékeny Chinese Spring (CS) tavaszi búza fagyállóságát (Sutka 1981). A legerősebb allélokat az 5A és 5D kromoszómák hordozzák, melyek szövettenyészetben is megnyilvánulnak (Galiba és Sutka 1988).

Sutka és Snape 1989-ben megkísérelte megállapítani az 5A kromoszómán elhelyezkedő fagyállóságot befolyásoló gén helyét. A kérdés vizsgálatára összesen 22 Hobbit/*Triticum spelta* 5A rekombináns vonalat használtak és azt állapították meg, hogy a fagyállóság génlókusza (*Fr-A1*) az 5A kromoszóma hosszú karján szorosan kapcsolt a vernalizációért felelős gén (*Vrn-A1*) lókuszával. Ez az eredmény nyitva hagyta a kérdést, hogy vajon a fagyállóság a *Vrn-A1* gén pleiotróp hatásának az eredménye, vagy pedig az *Fr-A1* és a *Vrn-A1* gének között szoros a genetikai kapcsoltság.

A Vrn-A1 és az Fr-A1 gén kapcsoltsági viszonyának tisztázásához Galiba és munkatársai (1995) olyan búza vonalakat vizsgáltak, ahol a kérdéses régióban genetikai rekombináció történt. A vonalak előállításához szülői partnerként két szubsztitúciós vonalat használtak. Az egyik a fagyálló, vernalizációt igénylő Chinese Spring/Cheyenne 5A (CS/CNN 5A), a másik a fagyérzékeny, vernalizációt nem igénylő Chinese Spring/*Triticum spelta* 5A (CS/TSP 5A) vonal volt. Mivel a rekombináns vonalak között találtak olyan növényt, ahol a két gén között rekombináció történt, így bizonyították, hogy bár e két gén szorosan kapcsolt, mégis szétválasztható. Az 5A kromoszómára deléciós vonalak vizsgálatával e két gén fizikailag is térképezhetővé vált, és megállapították, hogy a Vrn-A1 gén a 0,68– 0,78 töréspont közé, az *Fr-A1* pedig a 0,67–0,68 töréspont közé térképezhető (Sutka és mtsai. 1999).

További kísérletekben térképezték az 5-ös homeológ csoport többi kromoszómáján elhelyezkedő fagyállóságot és vernalizációs igényt meghatározó géneket, és megállapították, hogy a *Vrn-B1* gén az 5B, a *Vrn-D1* gén az 5D kromoszómán helyezkedik el (Law és mtsai. 1976, Nelson és mtsai. 1995, Snape és mtsai. 1997).

Az 5A kromoszóma fagytűrésben játszott központi szerepét Vágújfalvi és munkatársai (2003) alakorban (*Triticum monococcum* L. elvégzett kísérletei is megerősítették. Az 5A kromoszómán az *Fr-A1*-től 30 cM távolságra a centroméra felé egy új fagytűrési lókuszt térképeztek (*Fr-A2*), és ugyanebbe a pozícióba térképezték a COR14b hidegindukált protein expressziójáért felelős lókuszt, valamint a CBF3 hidegre indukálódó transzkripciós aktivátort. Ezek az eredmények részben megegyeznek a *Triticum aestivumon* kapott korábbi eredményekkel, melyek szerint a COR14b protein expresszióját két lókusz határozza meg az 5A kromoszómán, az egyik azonos a *Triticum monococcum*-ban térképezett *Fr-A2* régióval, a másik pedig kapcsolt az *Fr-A1* régióval (Vágújfalvi és mtsai. 2000).

Újabb vizsgálatokban kimutatták, hogy a búza hidegedződésre való képessége függ a vegetatív-generatív tranzíciótól (Limin és Fowler 2002; Fowler és mtsai. 1999). Megfigyelték, hogy miután a tenyészőcsúcs átmegy vegetatívból generatív fázisba, a növény fagytűrése hidegedzéssel nem növelhető.

2.1.3. Vernalizációs igényért felelős gének árpában

Árpában már 1970-ben jellemezték a vernalizációs igényért felelős 3 lókuszt morfológiai markerek segítségével (Takahashi és Yasuda 1970), majd a 90-es években molekuláris markerek segítségével megerősítették megállapításaikat. Az őszi jelleg a *Vrn-H2* (korábban *Sh*) lókuszon domináns, illetve a *Vrn-H1* (*Sh2*) és a *Vrn-H3* (*Sh3*) lókuszokon recesszív allélek megléte esetén alakul ki. Minden más allélkombináció ezen három gén között tavaszi, vagy fakultatív jelleget eredményez (Cattivelli és mtsai., 2002). A *Vrn-H2* a 4H, a *Vrn-H1* az 5H, míg a *Vrn-H3* az 1H kromoszómák hosszú karján helyezkedik el (Laurie és mtsai., 1995; 1997; Karsai és mtsai. 1997). A legnagyobb hatású vernalizációs gén a *Vrn-H1* árpában, és a *Vrn-A1* búzában. A gabonafélék, és főként a búza és az árpa között a gének sorrendjének konzerváltsága (kolinearítása) jól ismert. Közös RFLP markerek összehasonlítása azt mutatja, hogy a *Vrn-A1*-et hordozó régió a búzában, illetve az alakorban erősen konzervatív, és megfelel az árpában található *Vrn-H1* régiónak (Galiba és mtsai. 1995; Laurie és mtsai., 1995; 1997; Karsai és mtsai. 1997; Dubcovsky és mtsai., 1998), ami azt mutatja, hogy ezekben a növényekben az 5-ös kromoszóma a hidegadaptáció szempontjából rendkívül fontos géneket hordoz.

2.1.4. Az árpa fagytűréséért felelős fő régiók

gabonaféléknél a hidegedzés során számos hidegindukált Α gén expresszálódik, melyeket COR (Cold Regulated) géneknek nevezünk. Ennek ellenére a fagytűrés kialakításában csak kevés kromoszóma régió játszik szerepet (Cattivelli és mtsai., 1999; Cattivelli és mtsai., 2002). A búzához hasonlóan, árpában is találtak télállóságért felelős QTL-eket a 7(5H) kromoszómán (Hayes és mtsai. 1993., Pan és mtsai. 1994.), és a legnagyobb QTL hatás a hosszú kar 21%-os rekombinációs intervallumára esett. Ez a kromoszóma szakasz homeológ a búza 5A kromoszómáján található Vrn-Fr régióval, mellyel szoros kapcsoltságban helyezkednek el az Xpsr426, Xwg644 és Xcdo504 RFLP marker lókuszok (Kleinhofs és mtsai. 1993). Ez a szoros kapcsoltság adta a lehetőségét, hogy ezekből a markerekből kifejlesztett PCR-alapú markerek hasznosak lehetnek fagytűrő genotípusok szelektálására növénynemesítési programban. Későbbi vizsgálatokban további kolineáris markereket térképeztek ebben a régióban különböző gabonafélékben, és megerősítették a Vrn-Fr adaptációs génkomplex meglétét, hasonlóságát, és fontosságát árpa, T. monococcum, rozs, és rizs esetében (Dubcovsky és mtsai., 1998; Sarma és mtsai., 1998; Kato és mtsai., 1999). Ez arra utal, hogy az ebben a régióban térképezett fagytűrési QTL-ekhez kapcsolt molekuláris markerek kölcsönösen felhasználhatók az említett gabonafélékben.

A legújabb eredmények alapján azonban úgy tűnik, hogy az 5H kromoszómán nemcsak a Vrn-Fr régió felelős a fagytűrésért, hanem a centromérához közelebb eső kromoszóma szakasznak is szerepe van a tolerancia kialakításában. Choi és mtsai. (2002) ugyanis azt találták, hogy árpában bizonyos COR gének expressziójáért felelős CBF3 (Cold Binding Factor 3) transzkripciós faktort kódoló lókusz nem a Vrn-Fr régióban helyezkedik el, hanem a centromérához közelebb eső szakaszon. Ez a felfedezés összhangban áll a búzában leírtakkal, miszerint két kapcsolt, de eltérő lókusz regulálja a *cor14b* hidegindukált gén expresszióját, melyeket az 5A kromoszóma hosszú karjára térképeztek, és Rcg1-nek, ill. Rcg2-nek neveztek el. (Vágújfalvi és mtsai. 2000). Az Rcg2-t a jól ismert Fr-Al helyére térképezték, míg az Rcgl a centromérához közelebb helyezkedik el, és ko-szegregál a psr911 RFLP markerrel, továbbá kapcsolt a psb89, és psr637 markerekkel (Vágújfalvi és mtsai., 2000). Az Rcg1 lókuszról alakorban Vágújfalvi és munkatársai (2003) kimutatták, hogy egy fagytűrési QTLlel hozható összefüggésbe (Fr-A2), és ez a lókusz egybeesik a cor14b hidegindukált protein expressziójáért felelős lókusszal, valamint a CBF3 hidegre indukálódó transzkripciós aktivátor pozíciójával. Ezek az adatok azt mutatják, hogy árpában is két régió lehet felelős az 5H kromoszómához kapcsolt fagytűrési jellegért, tehát a Vrn-Fr régióhoz képest a centroméra irányában elhelyezkedő markerek is alkalmasak lehetnek fagytűrő genotípusok szelektálására.

2.2. Molekuláris markerek felhasználása szelekcióra

Ezidáig csak kevés molekuláris marker áll rendelkezésre fagytűrő genotípusok szelektálására gabonafélékben (Houde és mtsai. 1992; Storlie és mtsai. 1998). Más alkalmazásokra, főként patogének elleni rezisztencia, ill. minőségi tulajdonságok szelekciójára, már több eredmény található. Búzában a liszt színét meghatározó lókuszhoz kapcsolt STS markert fejlesztettek ki (Parker és mtsai. 2000), míg Briney és mtsai. (1998) keményítő, és tészta minőség szelektálására alkalmas PCR-alapú markerekről számoltak be. Decousset és mtsai. (2000) az árpa *Ppd-H1* génjéhez kapcsolt STS markereket fejlesztettek ki. Napraforgóban

specifikus, PCR-alapú markereket fejlesztettek ki RAPD, ill. AFLP markerekből a peronoszpórára rezisztens növények szelektálására (Brahm és mtsai. 2000).

Búzában Storlie és munkatársai (1998) azt vizsgálták, hogy az Fr-Al és Vrn-Al gént tartalmazó kromoszóma régiónak mekkora a fagyállóságot befolyásoló hatása. A Marfed tavaszi búzát keresztezték a Suweon 185 és a Chukoku 81 őszi és búzával a kapott F₁ hibridekből a Marfeddel való többszöri visszakeresztezésével közel izogén vonalakat hoztak létre. A hasonlóság a vonalak közt teoretikusan 99.6 % volt. A vonalakban a vrnl allél jelenlétét (őszi jelleg a tavaszi Marfed genetikai hátterében) az Xwg644 RFLP próbával tesztelték. Ez a próba ugyanis polimorfizmust mutatott a tavaszi és a két őszi fajta esetében. Az izogén vonalak fagyállósági tesztje a következő eredményt adta: A szülő Marfed LT_{50} –9,5 °C, a Chukoku 81 LT_{50} –12,9 °C a Marfed \times Chukoku izogén vonalak esetében az LT_{50} –11,5 °C, a Suweon 185 LT_{50} –15 °C és a Marfed × Suweon 185 izogén vonalak LT₅₀ értéke –14 °C volt. Az eredmények bizonyították, hogy azok a tavaszi × őszi keresztezésből származó vonalak, melyek tartalmazták az őszi jelleggel és egyúttal a fagyállósággal kapcsolt RFLP markert ténylegesen fagyállóbbak, mint a tavaszi szülő. Ez a modellkísérlet igazolta a molekuláris genetikai markerek hasznosíthatóságát a fagytűrés javítására kidolgozott nemesítési programban.

Iwaki és mtsai. (2002) leírták a *wg644* RFLP marker átalakítását PCR markerré, és felhasználását búzában a *Vrn-B1* gén genetikai analízisére, de nem tesztelték a markert nagyobb genotípus gyűjteményen, így nincsen adatuk a szelekcióban való felhasználhatóságáról.

2.3. A búza molekuláris analízise

A hexaploid búza rendkívül nagy genommérettel rendelkezik (17 x 10⁹ bázispár), melynek nagy részét (~ 80%) repetitív szekvenciák teszik ki. Bár ez a genomméret többszöröse a rizs genomnak, a két faj esetében a kódoló régiók mérete nem különbözik lényegesen, ugyanis a különböző fűfélék összehasonlító

17

térképezési adatai alapján megállapították, hogy a gabonafélék genomjai között nagy mértékű "makro" homeológia figyelhető meg (Gale és Devos 1998), ez igaz a hexaploid búza A, B és D genomja esetében, és az egyes gabonafajok genomjai között is. Így az egyes genomokban kapott térképezési eredmények támpontul szolgálnak más genomokban történő térképezésekhez. Boyko és munkatársai (2002) deléciós vonalak felhasználásával megyizsgálták a genetikai és a fizikai térképtávolságokat búzában, és azt találták, hogy a rekombinációs gyakoriság eltérő attól függően, hogy az adott régió a kromoszómán hol helyezkedik el. Citológiai vizsgálatokkal bizonyították, hogy a kiazmák gyakorisága a kromoszóma karok disztális részén jóval nagyobb, mint a centroméra közelében (Snape és mtsai. 1985), továbbá nagyobb rekombinációs gyakoriságot tapasztaltak a kromoszómáknak azon részein, ahol nagy a gének sűrűsége (Gill és mtsai 1996). A szekvenciák szintjén a gabonafélék genombeli eltéréseiben a retrotranszpozonok megléte is szerepet játszik. Dubcovsky és mtsai. (2001) árpa és rizs szekvenciákat analizáltak, és arra a következtetésre jutottak, hogy a jelenlegi gabonafélék genomjának evolúciójában nagy szerepet játszott a retrotranszpozonok beépülése és elszaporodása a genomban. Hasonló következtetésre jutottak búzában is (Wicker és mtsai. 2001).

Az élelmezésben betöltött szerepe miatt, intenzív markerezési és térképezési munkák folynak a hexaploid búzán, melynek eredményeként rendelkezésünkre állnak részletes RFLP (Chao és mtsai. 1989; Devos és Gale 1993), valamint mikroszatellit térképek (Röder és mtsai. 1998). Az RFLP térképek segítségével számos QTL-t azonosítottak (Galiba és mtsai. 1995; Snape és mtsai. 1997; Korzun és mtsai. 1997), azonban a mikroszatellit markerek felhasználása tűnik az egyik legígéretesebbnek a jelenlegi markerezési technikák közül (Plaschke és mtsai. 1995), bár a mikroszatellit markerek előállítása idő-, és munkaigényes, azonban alkalmazásuk egyszerű, és a mikroszatellitek a genomban egyenletesen, nagy számban fordulnak elő (Weber 1990). A közeljövőben a markerek következő generációja, az SNP (single nuclotide polymorphism) ugrásszerűen felgyorsíthatja a nagyfelbontású térképek készítését, és ezen ismeretek gyakorlati felhasználását (Koebner és Summers 2003).

2.4. Térképezési populációk

A genetikai térkép elkészítésének elengedhetetlen feltétele a megfelelő térképezési populáció. Ahhoz, hogy egy tulajdonságot térképezzünk, a kiindulási szülőket úgy kell kiválasztani, hogy azok genetikailag a megfelelő mértékben polimorfak, illetve a térképezni kívánt tulajdonságban eltérőek legyenek. Nagyon fontos, hogy a szülői genotípusok közötti távolság ne legyen túl nagy, mert ebben az esetben rekombinációs zavarok léphetnek fel, illetve ne legyen túl kicsi, mivel akkor kevés polimorfizmust fogunk kapni.

Többféle térképezési populáció ismeretes. A megfelelő térképezési populáció kiválasztásához figyelembe kell venni a vizsgált növény megtermékenyülési módját (önmegporzó, vagy idegen beporzó), a vizsgálat ismételhetőségének igényét, illetve a rendelkezésre álló időt, és citogenetikai hátteret.

Az F_2 , és visszakeresztezett (backcross, BC) populációk könnyen használhatók önmegporzó fajoknál, mint a búza, előállításuk gyors, azonban alkalmazásával csak korlátozott számú magot nyerhetünk, illetve egynyári növények esetében nem tudunk többszörös vizsgálatot végezni. Ezekben az esetekben stabilan fenntartható térképezési populációkkal kell dolgoznunk. Ezek közé tartoznak a rekombináns beltenyésztett vonalakból (recombinant inbred lines, RIL), vagy a dihaploid (doubled haploid, DH) vonalakból álló térképezési populációk. A rekombináns beltenyésztett vonalakat hat-nyolc generáción át tartó sorozatos önbeporzással állítják elő, mely után az egyedek gyakorlatilag homozigóták lesznek, és a kétféle szülőtől származó kromoszóma szegmenteket mozaikszerűen hordozzák (Mohan és mtsai. 1994). A dihaploid vonalakat a szülők keresztezéséből létrejött F_1 utódnemzedékből állítják elő az F_1 növények haploid gamétáiból származó (pl. portokkultúrák) kromoszómák megduplázásával. A DH populációk egyre jobban elterjedtek a gabonafélék genomjának vizsgálatában,

19

különösen az árpa genom térképezésében (Heun és mtsai. 1991; Graner és mtsai. 1991).

Ha előzetes kísérletekből ismert, hogy a vizsgált tulajdonságot befolyásoló gén(ek) melyik kromoszómán helyezkednek el, a térképezéshez egy kromoszómára rekombináns vonalakból (single chromosome recombinant lines) álló térképezési populáció is használható. Az egyik szülő egy normál genotípusú vonal, míg a másik szülő egy szubsztitúciós vonal, melynek az összes kromoszómája megegyezik az első szülőével, azonban a vizsgálni kívánt kromoszómája helyett egy attól eltérő kromoszómát hordoz. Az ilyen vonalakat úgy teszik stabilan fenntarthatóvá, hogy az F₁ növényt apai szülőként keresztezik egy monoszómás vonallal, melynek a vizsgálni kívánt egyik kromoszómája hiányzik. Ezután 41 kromoszómaszámú genotípusokra szelektálnak. Ezt az utódot önbeporozva a rekombináns kromoszómát megduplázzák (Law 1966).

2.5. Genetikai markerek

A genetikai marker olyan morfológiai tulajdonság (fenotípus), fehérje, vagy DNS fragment, mely alkalmas a növény valamilyen (külső, belső) tulajdonságának, vagy biológiai folyamatának jelölésére. Ebből következik, hogy a genetikai markerek az adott növény valamely DNS szakaszának nyomon követésére használhatók, így ha a növény genetikai állománya markerekkel jól lefedett, azaz genetikai állományának minden részén, általunk jól detektálható markerek vannak, egymástól nem túl nagy távolságokra, akkor a markerek segítségével a genetikai állomány közel teljes egésze nyomon követhető.

A genetikai marker lehet fenotípusos tulajdonság (morfológiai, élettani, agronómiai tulajdonság), és lehet valamilyen molekuláris technika segítségével kimutatható jelleg. Ez utóbbiakat molekuláris markereknek hívjuk. A molekuláris markerek csoportjába tartoznak a fehérje, illetve a DNS markerek. A fehérje markerek közül az alloenzimek (Markert és Moller 1959) a legáltalánosabban használtak. A fehérje markerek száma kicsi, ezért ezeket a növénynemesítésben csak szelekcióban, és fajtaazonosításra alkalmazzák.

A leggyakrabban használt markerek a DNS markerek, melyek a 80-as években jelentek meg, majd a PCR-alapú technikák megjelenésével robbanásszerűen elterjedtek (Nagy 1999). Előnyük, hogy nagyfokú variabilitást mutatnak, és a környezet, illetve a génkölcsönhatások nem befolyásolják megjelenésüket.

2.5.1. RFLP

A molekuláris markerek közül az egyik legfontosabb módszer az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein és mtsai. 1980), mely hamar alkalmazásra került a növénynemesítésben is (Burr és mtsai. 1983). Az RFLP technika segítségével jöttek létre az első, jó felbontású genetikai térképek paradicsomnál, és burgonyánál (Tanksley és mtsai. 1992). A módszer alapja a restrikciós felismerőhelyekben meglévő polimorfizmus. A vizsgálni kívánt egyedekből történő DNS izolálás után a DNS-t restrikciós enzimmel emésztik, majd agaróz gélelektroforézissel szétválasztják a kapott fragmenteket, és szilárd hordozóra viszik (Southern-blott). Próbaként, jelölt DNS-t (genomikus, ill. cDNS klónok, vagy szintetikus szekvenciák) hibridizálnak a fragmenteket hordozó membránhoz, majd a jelölésnek megfelelően detektálják. Ha egy restrikciós enzim felismerőhelyén szekvencia eltérés van két egyed között, akkor az egyik egyed esetében megvan a felismerőhely, míg a másikban nincs, így az adott enzim az egyik esetben képes emészteni a DNS-t, a másikban nem. A gélen történő elválasztás után a membránon különböző hosszúságú DNS fragmentek lesznek a vizsgált egyedekben, így a próbaként használt DNS is különböző méretű fragmentekhez hibridizál, amit detektálás után hossz polimorfizmusként láthatunk.

Az RFLP kiforrott technika, melynek ismételhetősége, megbízhatósága jó, de nagyon munka-, ill. időigényes, és nagy gyakorlat szükséges hozzá. Hátránya még, hogy fajlagosan drága, és általában radioaktív laborra van szükség hozzá.

21

2.5.2. AFLP

Bár kísérleteinkben nem használtuk, elterjedtsége miatt mégis említést érdemel az AFLP technika. Az AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos és mtsai 1995) PCR alapú markerezési eljárás, melyet a holland Keygene cég fejlesztett ki, és szabadalmaztatott. A módszer, hasonlóan az RFLP-hez, a genomikus DNS restrikciós polimorfizmusán alapszik, azzal a különbséggel, hogy az emésztett DNS szelektív felszaporítás után kerül elválasztásra, és detektálásra, nagy felbontóképességű gélelektroforézissel, így kis mennyiségű DNS is elegendő a vizsgálathoz. Az eljárás során össz-DNS restrikciós emésztése után (általában egy sűrűn, és egy ritkán vágó enzimmel), a kapott fragmentek túlnyúló végeihez kettősszálú adaptert ligálnak, majd az adapter szekvenciákkal komplementer primerekkel szelektív amplifikációt végeznek, és a felszaporított fragmenteket nagy felbontóképességű gélelektroforézissel elválasztják. A kapott fragmentek általában domináns jellegűek. A módszer rugalmassága, és különböző genomokhoz való adaptálhatósága abból adódik, hogy az amplifikáció során a primerek 3' végén elhelyezkedő "horgony" toldalékbázis(ok), és a felhasznált restrikciós enzimek kombinációinak segítségével a felszaporított fragmentek mennyisége az összfragmentek mennyiségének töredékére csökkenthető. Az AFLP tehát a különböző komplexitású genomok vizsgálatára egyaránt alkalmazható technika.

A módszer ismételhetősége jó, és magában hordozza a PCR-alapú technikák előnyeit (kis mennyiségű DNS szükséges hozzá, viszonylag rövid idő alatt kaphatunk eredményeket, radioaktív technikák mellőzhetők). A szelektív amplifikáció szintén előnye a módszernek a random amplifikációs technikákkal szemben. A már említett rugalmasság, és adaptálhatóság pedig az AFLP széles körű alkalmazhatóságát segíti elő.

2.5.3. RAPD

A RAPD (Random Amplified Polymorhpic DNA) random PCR amplifikáción alapuló markerezési eljárás, melyet két kutatócsoport egy időben publikált (Williams és mtsai. 1990, Welsh és McClelland 1990). A módszer, egy nem specifikus primerrel felszaporított, DNS fragmentek hosszának polimorfizmusán alapszik. Általában egy 10 bázispár hosszúságú, véletlen bázissorrendű primert használnak a PCR reakcióhoz, mely a genomi DNS szekvenciájában megtalálja a komplementer szekvenciáját ellentétes orientációban, és így 200 és 2000 bázispár hosszúságú mérettartományon belül szaporít fel fragmenteket, melyek agaróz gélen elválaszthatók. A primer rövidsége miatt, a PCR reakció egyéb körülményei sem specifikusak. A RAPD technikával általában domináns markereket kapnak.

A módszer előnye, hogy egyszerű, gyors, szinte minden genomon alkalmazható, kis mennyiségű DNS is elég a vizsgálathoz, és nem igényel előzetes szekvenciaismeretet a marker előállítása.

A RADP módszer hátrányai főleg a nem specifikus amplifikációból adódnak, emiatt az ismételhetőség érdekében nagyon pontosan kell reprodukálni az eredetileg használt PCR körülményeket (primer, és Mg²⁺ koncentráció, annealing hőmérséklet, DNS mennyisége, és minősége).

2.5.4. Mikroszatellit (SSR) markerek

A mikroszatellitek, más néven egyszerű szekvenciaismétlődések (Simple Sequence Repeats, SSR) az eukarióta genomra jellemző, variábilis szekvenciák, melyek 6 nukleotidnál rövidebb szekvenciák tandem ismétlődései. Az ismétlések száma 5 és 30 között változhat, genotípustól függően. A mikroszatellit szekvenciák a genomban egyenletesen oszlanak el (Weber 1990), és viszonylag nagy számban fordulnak elő, funkciójuk nem tisztázott. Növényekben Condit és Hubell (1991) végeztek először kísérleteket mikroszatellitekkel, "ujjlenyomat" analízisekhez pedig Weising és mtsai. (1991) alkalmazták először. Szója szekvenciák vizsgálatával Morgante és Olivieri (1993) kimutatták, hogy növényekben az AT ismétlődések vannak jelen a legnagyobb gyakorisággal, az emlősökben nagy gyakorisággal előforduló AC ismétlődésekkel szemben. Markerezési alkalmazhatóságuk genotípusonként eltérő, nagyfokú variabilitásukból fakad, mely ismétlődő motívumok számának eltéréseiből adódik. Kimutatásuk az

23

legegyszerűbb módja, a mikroszatelliteket határoló szekvenciákra tervezett primerekkel történő lókuszspecifikus amplifikáció, és kapott 100-300 bázispár hosszúságú termék nagyfelbontású szekvenálógélen történő elválasztása. Mivel a legtöbb esetben a polimorfizmus néhány bázispárnyi eltérésből adódik, ezért fontos a precíz, akár bázispáronkénti elválasztás, hogy a különbségek kimutathatóak legyenek. A mikroszatellit markerek kodomináns jellegű markerek.

Az amplifikációhoz szükséges primerek előállításához szükséges a határoló régiók szekvenciáinak ismerete, ezért azokat genomikus könyvtárakból azonosítják, kiemelik, majd a pozitív klónok szekvenálása után lókuszspecifikus primereket terveznek a repetitív szekvenciákat határoló régiókra, és ezekkel a primerekkel történik majd az adott régió szelektív amplifikációja.

A módszer hátránya, hogy a mikroszatellit markerek előállítása időigényes és drága eljárás, illetve a primerpárok általában fajspecifikusak. Ezt azonban ellensúlyozza számos előnye, mivel az analízis nagyon gyors, jól reprodukálható, és nagyon nagy a variabilitásuk.

2.6. Kapcsoltsági térkép

A növénynemesítésben és a genetikában az egyik alapvető cél, hogy a tulajdonságokat meghatározó gének kromoszómális lokalizációját, és egymáshoz viszonyított sorrendjüket meg tudjuk határozni. Erre az egyik módszer a genetikai térképezés, melynek Morgan (1910), és Sturtevant (1913) *Drosophila*-n végzett kísérletei teremtették meg az alapját (Kiss és Endre 1999; Kaló 2000). Megfigyelték, hogy vannak bizonyos tulajdonságok, melyek együttes előfordulási gyakorisága az utódokban nagyobb, mint az várható volt. Ez azt jelenti, hogy a tulajdonságok nem minden esetben öröklődnek függetlenül, hanem köztük kapcsoltság lehet. Sturtevant azt is megfigyelte, hogy a kapcsolt tulajdonságok kombinálódhatnak, azaz a szülőkétől eltérő kombinációk jelenhetnek meg az utódokban, tehát a tulajdonságokat hordozó gének között rekombinációk történhetnek. A gének között levő rekombinációs gyakoriság, arányos a gének távolságával, és a legnagyobb valószínűség (maximum-likelihood) módszer

alkalmazásával becsülhető meg (Allard 1956; Ritter 1990; Kiss és Endre 1999). A rekombináció az ivarsejtek kialakulásakor, a meiózis során lejátszódó crossing over-ek következménye, melyek a teljes genomban, előre nem prediktálható helyeken, és gyakorisággal következnek be. A gének közötti, rekombinációs gyakoriság felhasználásával számolt, távolságot térképtávolságnak hívjuk, és centimorganban (cM) fejezzük ki. Az 1 centimorgan távolság 1%-os rekombinációs gyakoriságnak felel meg. Mivel két, nagyobb távolságban levő, gén között többszörös crossing over is történhet, melyek torzíthatják a rekombinációs gyakoriságot, ezért térképfüggvény felhasználásával kaphatunk pontos térképtávolságokat, mivel az figyelembe veszi a többszörös rekombinációkat is. A leggyakrabban használt térképfüggvények a Haldane-, és a Kosambitérképfüggvények (Haldane 1919; Kosambi 1944).

Ahhoz, hogy genetikai térképet állítsunk elő, szegregáló térképezési populációra van szükségünk. A térképezési populáció egyedeinek meg kell határozni genotípusát a térképezni kívánt markerekkel, melyek lehetnek morfológiai, vagy molekuláris markerek. A genetikai analízis során meg kell határozni markerpáronként a rekombinációs gyakoriságot, amelyből térképfüggvények segítségével a köztük levő térképtávolság kiszámítható, majd hárompontos térképezésekkel megállapítható a markerek egymáshoz viszonyított elhelyezkedése. A közös markereket tartalmazó hárompontos térképek átfedéseivel kapjuk meg a kapcsoltsági csoportokat, és a gének sorrendjét. A génsorrendet, és a térképtávolságokat grafikusan ábrázolva kapjuk meg végül a genetikai térképet. Ez az eljárás bonyolult és hosszadalmas számításokat tartalmaz, de ma már rendelkezésünkre állnak fejlett, könnyen kezelhető számítógépes programok (MAPMAKER, JoinMap, MapQTL, QTL Cartographer), melyek segítségével a számítások gyorsan, és nagy megbízhatósággal elvégezhetők. Egy másik, praktikus módja a markersorrend ábrázolásának a színtérkép (Kiss és mtsai. 1998), amely egyszerű eljárás, és jól használható genetikai térképezésre, hibakeresésre és adott genotípusú egyedek válogatására.

2.7. QTL analízis

A kvantitatív öröklődésű tulajdonságok (quantitative trait loci, QTL) pontos tanulmányozása nem lehetséges a klasszikus Mendeli-genetika eszköztárával, mivel ezek a tulajdonságok általában több gén szabályozása alatt állnak, és megjelenésüket jelentősen befolyásolhatja a környezet hatása. Mivel a termesztett növények számos tulajdonsága kvantitatív öröklődést mutat, ezért vizsgálatuk nagy fontosságú, azonban ehhez szükséges a molekuláris markerek alkalmazása, és ezzel egyidejűleg a megfelelő biometriai eljárások kifejlesztése.

A legegyszerűbb biometriai eljárás a marker szerint képzett csoportokon végzett egyszerű variancia analízis (ANOVA) (Soller és mtsai. 1976). Az eljárás során a populáció egyedeit a marker eloszlás szerint csoportosítják, majd a vizsgálni kívánt tulajdonság, csoportokhoz rendelt, fenotípusos átlagértékeivel variancia analízist végeznek, aminek a segítségével meghatározzák, hogy mely csoportok különböznek egymástól szignifikánsan. A szignifikáns eltérés jelzi, hogy az adott marker kapcsolt a tulajdonsággal. Regressziós analízissel a marker és a QTL közti kapcsolat közelsége számszerűsíthető. Bár az eljárás egyszerű, azonban számos hiányossága van (Lander és Botstein 1989): a) ha a QTL nem pontosan a marker lókusznál található, akkor a QTL és a marker lókusz között rekombináció fordulhat elő, melynek gyakorisága a távolsággal nő, így a QTL hatást jelentősen alulbecsülhetjük, b) a módszer nem ad becslést a QTL pozíciójára a kapcsoltsági térképen, csak a markerhez kapcsoltságot állapítja meg, így nem tudunk különbséget tenni a szorosan kapcsolt kis hatású QTL, és kevésbé kapcsolt nagy hatású QTL között, c) az eljárás nem ad információt a markerhez kapcsolt QTL-ek számáról, d) markerhez nem kapcsolt, szegregáló QTL-ek jelenléte növelheti az alap varianciát, így a vizsgált QTL-t a ténylegesnél alacsonyabb valószínűséggel detektáljuk.

A hibák ellenére a módszer kiválóan alkalmas QTL detektálásra előkísérletekben, illetve amikor nem áll rendelkezésre részletes kapcsoltsági térkép (Haley és Knott 1992). Az előbb említett hiányosságok jó részét kiszűri az egyszerű intervallum térképezéssel (Simple Intervall Mapping) történő QTL-analízis (Lander és Botstein 1989). A regressziós analízistől eltérően, az egyszerű intervallum térképezés lehetővé teszi a QTL-ek nagy pontosságú becslését a markerekkel lefedett teljes genomi régión. A módszerhez jó felbontású, pontos kapcsoltsági térkép szükséges, amely ennek felhasználással valószínűségi becslést ad a QTL pozíciójára, és a hatására LOD érték segítségével. A LOD a likelihood ratio (LR) 10-es alapú logaritmusa. Egy adott genomi pozícióra számolt likelihood ratio a feltételezett QTL meglétének maximális valószínűsége / a feltételezett QTL hiányának maximális valószínűsége. A LOD érték tehát számszerűsíti, hogy a megfigyelt adatok bekövetkezésének valószínűsége mennyivel nagyobb, ha az adott helyen egy QTL van, mint ha nincs. A LOD érték minden egyes centimorganra kiszámolható a kapcsoltsági térkép teljes hosszában, és ezeket az értékeket a térkép pozíciók függvényében ábrázolva kapjuk meg a QTL-valószínűségi térképet (QTL likelihood map).

A LOD érték teszt statisztikaként használható annak a hipotézisnek a tesztelésére, hogy az adott pozícióban QTL van jelen. Ehhez egy LOD küszöbértéket kell megadnunk, a kiszűrni kívánt fals pozitív szintnek megfelelően. A null hipotézisünket, hogy az adott pozícióban nincsen szegregáló QTL, csak akkor vethetjük el, ha a LOD érték az adott pozícióban meghaladja a küszöbértéket. A LOD küszöbérték megállapításához figyelembe kell venni a vizsgált genom méretét, a kapcsoltsági csoportok számát, a markerek számát, és elrendeződését a kapcsoltsági csoportokon belül, és a térképezési populáció típusát.

Az egyszerű intervallum térképezés a QTL-ek nagy pontosságú becslését teszi lehetővé, azonban csak akkor ad megbízható eredményt, ha a populáció az adott kvantitatív tulajdonságban nem tartalmaz egynél több QTL-t a vizsgált intervallumban. Ha ez a kezdeti feltétel nincs meg, akkor a QTL pozíciójának, és hatásának becslésekor téves adatokat kaphatunk (Stam 1991; Knott és Haley 1992; Martinez és Curnow 1992), például két ellentétes hatású kapcsolt QTL kiolthatja egymást, így egyiket sem tudjuk kimutatni. Több, nem kapcsolt QTL jelenléte is

kedvezőtlenül befolyásolhatja azok detektálását. Ahhoz, hogy egy populáción egyszerre több szegregáló QTL-t analizáljunk nagy pontossággal, összetett intervallum térképezést (Composite Intervallum Mapping) kell alkalmaznunk (Jansen 1993; Jansen 1994; Jansen és Stam 1994; Zeng 1994). Ez a megközelítés az egyedi QTL-ek intervallum térképezéssel való azonosításából, és a vizsgált intervallumon kívül található markerekkel történő regressziós analízisből áll, melynek segítségével meghatározható a QTL hatása az intervallumon kívül, így a QTL helye, és pozíciója az intervallumon belül nagyobb pontossággal becsülhető meg. Jelenleg több számítógépes programcsomag is elérhető, melyek segítségével a QTL analízis pontosan, és gyorsan végrehajtható (QTL Cartographer, PLABQTL, MapQTL, QTL Cafe, stb.).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

3.1.1. Térképezési populációk

Kísérleteinkhez két búza térképezési populációt használtunk. Az első térképezési populáció 61 darab egy kromoszómára rekombináns vonalból áll, melyek Chinese Spring (CS) és a Chinese Spring (Cheyenne 5B) szülők keresztezéséből származnak. A másik térképezési populáció 76 egy kromoszómára rekombináns vonalból áll, mely a Hobbit és Hobbit (Chinese Spring 5BL) szülőktől származik.

3.1.2. Virágzási idő meghatározása

A Chinese Spring (CS) és Chinese Spring (Cheyenne 5B) szülők keresztezéséből származó térképezési populáció esetében a Chinese Spring genetikai háttér miatt minden vonal hordozza a tavaszi Vrn-D1 allélt az 5D kromoszómán, emiatt minden rekombináns vonal virágzik vernalizáció hiányában is, azonban a virágzási időben meglevő különbségek főként a Vrn-B1 allélvariációinak tulajdoníthatók, ugyanis a Chinese Spring 5B kromoszóma vernalizációra érzéketlen (lévén tavaszi búza), Vrn-B1, allélt hordoz, míg a Cheyenne 5B kromoszóma vernalizációra érzékeny (lévén őszi búza), vrn-B1, alléllel rendelkezik. Ennek megfelelően minden rekombinánsból 10 vernalizálatlan növényt, illetve a szülői kontrollokat neveltünk növénynevelő kamrában, 16/8 órás világos/sötét ciklusban; 20 °C-on, random elrendezésben. Ezzel szemben, teljes vernalizációt követően a virágzási időben levő különbségek vernalizációra érzéketlen lókuszok hatásának tulajdoníthatók (koraisági lókuszok). Az 5B kromoszómán elhelyezkedő koraisági lókuszok kimutatására a Hobbit (Chinese Spring 5B) rekombináns szubsztitúciós vonalak mindegyikéből 5 vernalizált (6 hétig 6 °C-on, 8/16 órás nappal/éjszaka ciklusban nevelt) növényt, illetve a szülői kontrollokat neveltünk növénynevelő kamrában, 16/8 órás világos/sötét ciklusban;

20 °C-on, random elrendezésben. Minden egyes növényen felvételeztük a virágzási időt, amit a vetéstől, az első kalász kibújásáig számított napok száma ad meg.

3.1.3. Hidegedzés és a fagyállóság tesztelése

A Chinese Spring és Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáció (57 vonal) hidegtűrésének tesztelését Sutka (1981) által kidolgozott módszer szerint végeztük, vonalanként 10 növénnyel, randomizált elrendezésben. Ennek során az első 5 hétben a növényeket folyamatosan csökkenő hőmérsékleten és megvilágításban neveltük. A 6. hét során 2 °C-os nappali és -2 °C -os éjszakai hőmérsékleten hidegedzettük a növényeket 20 órás megvilágítással. Az edzés folytatásaként a hőmérsékletet 1 °C /óránként -4 °C -ra csökkentettük, és a növényeket két napig sötétben tartottuk. Ezután történt a növények fagyasztása – 11, és –12 °C -on. 24 órás, sötétben történt fagyasztás után a hőmérsékletet 2 °C /óránként +1 °C -ra emeltük, és a növényeket 15 óra hosszan ezen a hőfokon tartottuk. Regeneráció céljából a növényeket 18 napig 16 °C nappali/15 °C éjszakai hőmérsékleten 14 órás megvilágítással neveltük, majd a regeneráció mértékének megfelelően bonitáltuk 0-tól 5-ig terjedő skálán, ahol az 5-ös érték a teljes regenerációnak felelt meg.

3.1.4. DNS izolálás

A térképezési populáció tagjaiból növényenként 5 g friss tömegű levélmintát használtunk DNS izolálás céljára. A leveleket folyékony nitrogénben finom porrá dörzsöltük, és 50 ml-es csőbe helyeztük. A mintához 20 ml "S" puffert (100 mM Tris.Cl pH 8,5; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA pH 8,0; 2 % SDS), és 100 μl 10 mg/ml-es Proteináz K-t adtunk, majd finoman összekevertük, és 65 °C -on 1-2 óráig inkubáltuk. Az inkubálás után 20 ml fenol/kloroformmal extraháltuk a mintákat, és 2000 rpm-en 20 percig centrifugáltuk a fázisok szétválasztása céljából. A vizes fázisból 0,6 térfogat izo-propanol hozzáadásával csaptuk ki a nukleinsavakat, és a csapadékot horoggá hajlított Pasteur-pipetta felhasználásával

30

halásztuk ki, majd 70 %-os etanollal mostuk és hagytuk megszáradni. A megszáradt csapadékot 5 ml Tris-EDTA pufferben (pH 8,0) teljesen feloldottuk, 10 µl 10mg/ml-es RN-áz oldatot adtunk hozzá, és 37 °C-on 1 óráig inkubáltuk az egyszálú RNS molekulák emésztése céljából. Ezután megismételtük a fenol/kloroformos extrakciót, majd a vizes fázisból 1/10 térfogat 3 M-os nátrium-acetát (pH 5,2), és 2 térfogat 96 %-os etanol hozzáadásával kicsaptuk a DNS-t. A csapadékot ismét hajlított Pasteur-pipetta segítségével halásztuk ki, etanollal mostuk és megszárítottuk. Száradás után TE pufferben oldottuk vissza a DNS-t, majd 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük a minőségét és meghatároztuk a koncentrációját.

3.1.5. Mikroszatellit analízis

Az 5B kromoszóma genetikai térképét SSR markerek segítségével készítettük el a CS x CS(Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, míg a Hobbit x Hobbit (CS 5BL) keresztezésből származó térképezési populáció esetében SSR és RFLP markereket használtunk. Az RFLP adatok a térképezési populáción korábban végzett kísérletekből származtak (Zhang és mtsai. 1998). Az 5B kromoszóma-specifikus SSR markerek kiválasztása után PCR reakciót végeztünk a térképezési populáció szülőinek DNS-ével, mint templáttal, illetve a kiválasztott mikroszatellit primerekkel. A PCR reakciót PTC-225 DNA Engine Tetrad (MJ Research) készülékkel, 15 µl végtérfogatban végeztük, amely 1,5 µl 10x PCR puffert (Invitrogen), 0,45µl 50mM-os MgCl₂-ot (Invitrogen), 1 µl 2mM-os dNTP-t (Invitrogen), 1,5µl 2µM-os mikroszatellit primer keveréket, 0,35 unit Taq polimerázt (Invitrogen) és 100 ng templát DNS-t tartalmazott. Az egyes primer párokhoz tartozó PCR paramétereket és primer kapcsolódási hőmérsékleteket a markerek kifejlesztőinek korábban publikált adatai szerint alkalmaztuk (Röder és mtsai. 1998: Wheat Microsatellite Consortium). A PCR termékeket szekvenálógélen (Savant Instruments, Inc.) választottuk el, és ezüstfestéssel detektáltuk standard módszer szerint (Bassam és mtsai. 1991). A szülők között polimorfizmust adó próbákkal teszteltük a térképezési populáció tagjait.

3.1.6. Kapcsoltsági térkép készítése és QTL analízis

A kapcsoltsági térképet JoinMap (Stam 1993) programmal állítottuk össze, és a rekombinációs frekvenciákból a Kosambi térképfüggvény segítségével kaptuk meg a térképtávolságokat centimorganban (cM) (Kosambi 1944)

A QTL analízist először a QTL Cafe (<u>http://sun1.bham.ac.uk/g.g.seaton</u>) programmal végeztük, mely ANOVA, egyszerű intervallum térképezés (Haley és Knott 1992), és marker regresszió (Kearsey és Hyne 1994) funkciókkal rendelkezik. Az így lokalizált, feltételezett QTL-ek meglétét összetett intervallum térképezéssel (Jansen és Stam 1994) erősítettük meg, MapQTL szoftver segítségével.

A számítógépes adatok ellenőrzése céljából színtérképezést végeztünk a Kiss és mtsai. (1998) által leírt módszer alapján.

3.2. PCR-alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

3.2.1. Növényi anyag

Kísérleteinket különböző fagytűrésű őszi és tavaszi árpa fajtákon és vonalakon végeztük, melyeket a Kísérleti Gabonakutató Intézet (Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Fiorenzuola (PC), Italia) genotípus gyűjteményéből válogattunk össze. Az általunk vizsgált genotípusok kiválasztása korábban elvégzett több éves szántóföldi tesztek (Rizza és mtsai., 1994; ill. nem publikált adatok) alapján történt, melyek során meghatározásra kerültek a genotípusok növekedési jellegei, ill. fagytűrésük. Az Eredmények fejezetben, a 3. Táblázatban láthatók a vizsgált genotípusok, és az egyes genotípusokhoz tartozó növekedési jellegek, ill. fagytűrési értékek. A kiválogatásuk úgy történt, hogy egyaránt vannak köztük fagytűrő (15 db), és fagyérzékeny (13 db) genotípusok. A fagyérzékeny genotípusok között találhatók őszi és tavaszi genotípusok is, abból az

okból, hogy olyan markereket találjunk, melyek tisztán a fagytűrési jelleghez kapcsoltak, nem pedig a növekedési jelleghez. Ezenkívül egy egyedi genotípus (Pilastro) is bekerült a genotípus teszt gyűjteménybe, mely Olaszországban őszi árpaként van regisztrálva, azonban nagyon fagyérzékeny (Rizza és mtsai., 1994). A teszt kollekció összeállításánál figyeltünk arra is, hogy két-, és hatsoros genotípusok egyaránt szerepeljenek benne, illetve szerepeljenek benne fajták, tájfajták (Turkey 166, Populazione Scandella), nemesítési vonalak (VRH422), és az egyes genotípusok eredete is különböző legyen.

3.2.2. Fenotipizálás (F_v/F_m paraméter meghatározása)

A kiválasztott genotípusok fagytűrésének kontrollált körülmények között történő, gyors meghatározására egy fiziológiai paraméter, az úgynevezett F_v/F_m érték meghatározását végeztük el. A növények II. fotokémiai rendszerének (PSII) által okozott működésbeli változását PSII fagyás а maximális kvantumhatásfokának meghatározásával állapítottuk meg, mely a sötétadaptált növény változó (F_v) és maximális (F_m) fluoreszcenciájának aránya (F_v/F_m) (Butler és Kitajima 1975). A méréseket Rizza és mtsai (2001) által leírt módszer szerint végeztük 3 ismétlésben PAM2000 (Walz, Effeltrich, Germany) típusú fluorométerrel. A módszer alkalmasságát a fagytűrés indirekt meghatározására zab esetében mutatták ki Rizza és mtsai (2001), ill. nem publikált adataink szerint árpában is jó korreláció volt megfigyelhető a fagytűrés és az F_v/F_m értékek között.

3.2.3. DNS izolálás

A DNS izoláláshoz 300 mg friss levelet használtunk három hetes árpa növényekből. A leveleket folyékony nitrogénben finom porrá törtük, majd totál DNS-t izoláltunk Nucleon PhytoPure Genomic DNA Extraction kit (Amersham) felhasználásával, a gyártó útmutatásait követve.

3.2.4. Primer tervezés és PCR analízis

Kísérleteinkben 16 RFLP markert használtunk, melyeket a búza 5A, és az árpa 5H kromoszómáján az *Rcg1 (psb89, psb85, psr911, psr637, cdo57)*, illetve az *Fr1 (cdo504, wg644, psr370, psr426, psr164, aba2-psr2021, cdo465, bcd450, cdo353, abg702, psr145*) régiókra térképeztek. A próbák bázissorrendjét nyilvános adatbázisokból, illetve a *psr* próbák esetében prof. M.D. Gale (John Innes Centre, Norwich, UK) segítségével szereztük meg. A szekvencia adatok felhasználásával specifikus, 20-27 bp hosszúságú, primerpárokat terveztünk, PC Gene számítógépes program segítségével. Hét próbánál (*wg644, cdo57, psr911, psr637, psr370, bcd450, cdo353*) a teljes RFLP klónok szekvenciáinak hiányában duplikált, nem átfedő szekvenciák álltak rendelkezésünkre, melyek a teljes klónok 5', illetve 3' részét fedték le. Ezekben az esetekben mindkét szekvenciára terveztünk primereket.

A PCR reakciókat 20 μl végtérfogatban végeztük, amely 1,5 mM MgCl₂-ot, 0,25 mM dNTP-t, 0,2 μM primert, 0,25 U AmpliTaq Gold polimerázt (Applied Biosystem), 1x PCR puffert és 20 ng templát DNS-t tartalmazott. A reakciókat 6 perc 94°C-os denaturációval kezdtük, amit 35 PCR ciklus követett (94°C, 1 perc; 55°, vagy 60°C, 1 perc; 72°C, 1 perc), végül 6 perces terminális DNS szintézis következett 72°C-on. A PCR reakciókat PE9600 (Applied Biosystem) készülékkel végeztük. Az optimális primerkapcsolódási hőmérséklet primerpáronként eltérő volt, a két STS polimorfizmus esetében a pontos hőmérséklet, illetve szekvencia az 1. Táblázatban található.

1. Táblázat: A *wg644_3* és a *psr637F* RFLP próbákhoz tervezett primerek hossza, szekvenciája, optimális kapcsolási hőmérséklete és a kapott fragmentek várható hosszúsága.

RFLP klón	Primer név	Hossz (bp)	Szekvencia (5'-3')	T _a (°C)	T _m (°C)	Termék mérete (bp)
WG644_3	WG644_3F	22	CTACGACAAACCTTTCGGAACG	54	56	215
	WG644_3R	20	GAATTTACGCACGACAGCCG	••	56	
PSR637F	PSR637FF	27	AGACTGGGAGCATGGACTAACATCTGG	56	62	282
	PSR637FR	27	AACATTAGGTGATGAGAAAAAGGAGCC	- 0	59	

Az amplifikációs termékeket BioRad Sub Cell mod. 192 típusú futtató kádban, 2,5%-os agaróz gélen (Gibco), 100 V-os konstans feszültségen választottuk szét, és etídium-bromiddal detektáltuk.

3.2.5. RAPD analízis

Vizsgálataink során, genotípus gyűjteményünkön teszteltük az *OPA17* RAPD markert is, mivel korábbi eredmények azt mutatják, hogy ez a próba szintén az 5H kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (Pecchioni és mtsai., 2001). A PCR reakciót 20 µl végtérfogatban végeztük, amely 2 µl 10x PCR puffert (Invitrogen), 0,6 µl 50 mM MgCl₂-ot, 0,2 µl 10 mM dNTP-t (Invitrogen), 0,3 µl 10 µM *OPA17* RAPD primert (5'-GACCGCTTGT-3'), 0,2 µl 5U/µl Taq polimerázt (Invitrogen), és 20 ng templát DNS-t tartalmazott. Két perces 94°C-os denaturáció után, 46 PCR ciklus következett (94°C, 1 perc; 30°C, 1 perc; 72°C, 2 perc), majd 10 perc 72°Cos terminális DNS szintézis. A PCR termékeket BioRad Sub Cell mod. 192 típusú futtató kádban, 2,5%-os agaróz gélen (Gibco), 100 V-os konstans feszültségen választottuk szét, és etídium-bromiddal detektáltuk.

3.2.6. PCR termékek genetikai térképezése

A *wg644* és a *psr637* polimorf STS markereket, illetve az *OPA17* RAPD markert árpán térképeztük, hogy a kromoszómális lokalizációjukat meghatározzuk, és megvizsgáljuk esetleges kapcsoltságukat fagytűrési QTL-ekhez. Ebből a célból, a felszaporított polimorf DNS fragmenteket 136 árpa dihaploid vonalon teszteltük, melyek a Nure x Tremois keresztezésből származtak. A kapcsoltsági térképet a MAPMAKER szoftvercsomag DOS 3.0 verziójával végeztük (Lander és mtsai., 1987), és küszöbértékként 3.0-as minimum LOD értéket használtunk.
4. EREDMÉNYEK

4.1. Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

4.1.1. Vrn-B1 térképezése

Az első térképezési populáció szüleinek átlagos virágzási ideje nem vernalizált körülmények között 70,6±2,97 nap volt a Chinese Spring és 75,6±1,08 nap a Chinese Spring (Cheyenne 5B) esetében. A rekombináns szubsztitúciós vonalak virágzási ideje a 66,4 naptól a 88,4 napig terjedő tartományba esett. Ez az adatsor transzgresszív szegregációt mutatott, mely két ellentétes hatású lókusz jelenlétét valószínűsítette.

A szülők között 9 SSR marker mutatott polimorfizmust az 5B kromoszóma



Intervallum térképezés

Centroméra

Teloméra —

1. ábra: A virágzási idő QTL valószínűségi görbéje (F-érték variancia arány; $F_{0,01}$ =2,63) az 5B kromoszóma hosszú karján a CS x CS (Cheyenne 5B) térképezési populáción. A növényeket vernalizáció nélkül neveltük.

A távolságok az X-tengelyen, centimorganban láthatók a bal oldali markertől számolva. A markerek

az X-tengely alatt vannak feltüntetve

hosszú karján, melyeket leteszteltünk a térképezési populáció egyedein is. Az 5B kromoszóma hosszú karjának genetikai térképe 92 cM-t fedett le (1. ábra) 12 cM átlagos távolsággal az egyes markerek között. A legnagyobb hézag 21 cM, amely az *Xgwm408*, és *Xgwm604* SSR lókuszok között helyezkedett el.

A QTL Café-vel elvégzett marker regressziós és egyszerű intervallum térképezéses analízissel két, virágzási időt befolyásoló, QTL elhelyezkedését sikerült meghatároznunk, melyet az összetett intervallum térképezés is megerősített (2. Táblázat). Az elsődleges QTL az 5B kromoszóma hosszú karján, disztálisan helyezkedett el, 78 cM-ra a centromérához térképezett SSR markerektől, szorosan kapcsoltan az *Xgwm604* lókuszhoz, és disztálisan az *Xgwm408* lókusztól. Ennek a QTL-nek az additív hatása 1,76 nap volt, és a fenotípusos variancia 10,7%-t magyarázta. A késői allélt a Cheyenne 5B kromoszómája hordozta.

Röder és munkatársai (1998) kimutatták, hogy az *Xgwm604*, és az *Xgwm408* mikroszatellit lókuszok az 5-ös csoport kromoszómáin szorosan kapcsoltak

^{2.} Táblázat: A CS x CS Cheyenne 5B) és a Hobbit x Hobbit (CS 5B) rekombináns szubsztitúciós vonalakból álló térképezési populáción végzett QTL analízis (MQM mapping): a QTL-hez legközelebbi marker, a QTL addítív hatása és a fenotípusos variancia hány százalékát magyarázza.

Tulajdonság	Legközelebbi	Additív	Fenotípusos variancia hány
	marker	hatás	százalékát magyarázza
CS x CS (Che okoznak)	yenne 5B) populáció (* Chey	venne allélek későbbi v	irágzást és nagyobb fagytűrést
Virágzási idő	Xgwm604	1,76 nap*	10,7
	Xwmc73	1,49 nap*	8,2
Fagytűrés (-11	1°C) Xgwm639	0,53 egység*	31,4
(-12	2°C) Xgwm639	0,33 egység*	12,0
Hobbit x Hob	bit (CS 5B) populáció (* Hot	bit allél későbbi virágz	zást okoz)
Virágzási idő	Xgwm499	1,21 nap*	5,7

(9,7 cM, és 4,5 cM) az Xcdo504-5B RFLP lókuszhoz. A homeológ Xcdo504-5A RFLP lókusz az 5A kromoszóma hosszú karján szorosan kapcsolt a Vrn-A1

vernalizációs génnel (Galiba és mtsai. 1995). Figyelembe véve az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak hasonlóságát, ez az 5B kromoszómán talált QTL a *Vrn-B1* génnek felelhet meg.

4.1.2. Koraisági lókuszok térképezése

A Chinese Spring/Cheyenne 5B populáción talált, virágzási időt befolyásoló, másodlagos szegregáló QTL kevésbé kifejezett, de szignifikáns hatásúnak mutatkozott. Az additív hatása 1,49 nap volt, és a fenotípusos variancia 8,2%-t magyarázta (2. Táblázat). Ez a QTL a centromérához közel, az *Xwmc73* SSR lókusszal kapcsoltan helyezkedett el (1. ábra). Korábbi, árpán végzett térképezési kísérletekkel kimutatták egy koraisági (*Eps*) QTL jelenlétét homeológ pozícióban (Laurie és mtsai. 1995, Snape és mtsai. 2001), ezért feltételeztük, hogy az általunk talált QTL is egy *Eps* lókusz, és a *Eps-5BL* nevet adtuk neki. Ennek a hipotézisnek az alátámasztására, a Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó, teljesen vernalizált térképezési populáció virágzási idejét vizsgáltuk

A két szülő átlagos virágzási ideje 88,5±2,6 nap volt a Hobbit, és 86±3,7 nap a Hobbit (Chinese Spring 5BL) esetében. A rekombináns szubsztitúciós vonalak virágzási ideje a 77,6 naptól a 102,7 napig terjedő tartományba esett, tehát szintén transzgresszív szegregációt mutatott, legalább két ellentétes hatású lókusz meglétét jelezve.

A szülők között 9 mikroszatellit, és 5 RFLP marker mutatott polimorfizmust, ezekkel teszteltük a Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) rekombináns vonalainkat. Az 5B kromoszóma hosszú karjának genetikai térképe 68 cM-t fedett le, a markerek közötti átlagos távolság 6,8 cM volt (2. ábra). Az *Xcdo504* RFLP lókusztól proximálisan egy 22 cM nagyságú markerekkel kitöltetlen hézag volt. Röder és munkatársai (1998) eredményeivel összhangban, az *Xcdo504-5B* és *Xgwm40*8 lókuszok közötti szoros kapcsoltság (2 cM) megerősítést nyert. Az *Xgwm604* SSR markert nem tudtuk térképezni ezen a populáción, mivel az nem mutatott polimorfizmust a szülők között.

39

Bár a transzgresszív szegregáció arra utalt, hogy valószínűleg két ellentétes hatású lókusz szegregál ebben a populációban, a QTL analízissel (egyszerű, és összetett intervallum térképezés) csak egyetlen, a virágzási időt befolyásoló, QTL jelenlétét sikerült kimutatni (2. Táblázat, 2. ábra), amely a centromérához közel (kb. 16 cM), és az *Xgwm499* SSR lókuszhoz kapcsoltan helyezkedett el, és valószínűsíthető, hogy egy *Eps* lókuszról van szó. A QTL-nek az additív hatása 1,2



2. ábra: A virágzási idő QTL valószínűségi görbéje (F-érték variancia arány; $F_{0,01}$ =3,34) az 5B kromoszóma hosszú karján a Hobbit x Hobbit (CS 5BL) térképezési populáción. A növényeket teljesen vernalizáltuk.

A távolságok az X-tengelyen, centimorganban láthatók a bal oldali markertől számolva. A markerek az X-tengely alatt vannak feltüntetve.

nap volt, és a fenotípusos variancia 5,7%-t magyarázta ebben a keresztezésben.

4.1.3. Fr-B1 térképezése

A fagyasztási tesztet követően a szülők bonitálási értékei –11 °C-on 1,8 (Chinese Spring), és 2,8 (Chinese Spring(Cheyenne5B)) voltak, míg –12 °C -os fagyasztást követően 0,5 (Chinese Spring), és 2,0 (Chinese Spring(Cheyenne5B)).

A rekombináns szubsztitúciós vonalakhoz tartozó bonitálási értékek –11 °C -os fagyasztást követően a 0,9-től 3,4-ig terjedő tartományba estek, –12 °C -os fagyasztásnál pedig 0,05-től 3,0-ig. A QTL analízisnél a *Vrn-B1* térképezésénél használt térképet vettük figyelembe, kivéve négy hiányzó vonalat.

A térképezési adatok, és a bonitálási értékek felhasználásával, marker regressziós, egyszerű, és összetett intervallum térképezést követően egy darab QTL-t találtunk 40 cM-ra a centromérához legközelebb eső markertől, és a QTL azonos pozícióban helyezkedett el mind a -11 °C-os, mind a -12 °C-os fagyasztási



Centroméra

Teloméra 🔶

3.**ábra:** A fagytűrési QTL valószínűségi görbéje (F-érték variancia arány; $F_{0,01}$ =2,63) az 5B kromoszóma hosszú karján a CS x CS (Cheyenne 5B) térképezési populáción. A növényeket –11, és – 12 C°-on fagyasztottuk.

A távolságok az X-tengelyen, centimorganban láthatók a bal oldali markertől számolva. A markerek az X-tengely alatt vannak feltüntetve.

adatok esetében (3. ábra). A QTL szorosan kapcsolt az *Xgwm639* SSR lókusszal, és additív hatása 0,53, ill. 0,33 volt -11 °C és -12 °C -on, és a fenotípusos variancia 31,4%-t magyarázta -11 °C -on, tehát jelentős a hatása (2. Táblázat).

4.2. PCR alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

A meglevő térképezési adatok gyakorlati felhasználásának az egyik módja lehet az egyes jellegekhez kapcsolt markerek alkalmazása az adott tulajdonságra történő szelekcióra. Ezekben a kísérleteinkben a gabonafélék 5-ös homeológ kromoszómáinak a fagytűrésért felelős régióira térképezett RFLP markerek PCRalapú markerekké átalakítását, illetve egyéb – fagytűrő genotípusok szelekciójára használható – PCR alapú markerek árpában történő tesztelését és térképezését végeztük el.

4.2.1. Fenotipizálás

A 3. Táblázatban láthatók a vizsgált fagytűrő (T1-T15), és fagyérzékeny (S1-S13) árpa genotípusok. A genotípusok télállóság szerinti csoportosítása két éves szántóföldi kísérletek (Fiorenzuola, Észak-Olaszország) eredményein alapszik, melyeket 0-tól 9-ig terjedő bonitálási értékekkel jellemeztünk.

Az 3. Táblázatban szerepelnek a kontrollált körülmények között végzett fagyasztási teszt eredményei is (F_v/F_m értékek). Az ebben a kísérletben kapott eredmények alátámasztották a genotípusok fagytűrés szerinti csoportosítását. A fagytűrő genotípusok átlagos F_v/F_m értéke 0,62 volt, a legalacsonyabb érték 0,42 (Opale), míg a legmagasabb 0,78 (Bulgarian) volt. A fagyérzékeny genotípusok esetében átlagos F_v/F_m értéknek 0,14-et határoztunk meg, a legalacsonyabb érték 0,02 (Volla), míg a legmagasabb érték 0,32 (Impala) volt. Látható, hogy a két csoport átlagos F_v/F_m értékei között jelentős különbség mutatkozott.

4.2.2. STS markerek kifejlesztése és tesztelése

Az RFLP markerek szekvenciái alapján készült primereket először a Nure és Tremois fajtákon teszteltük, hogy használhatók-e polimorf STS markerekként. E két fajta fagytűrése karakteresen eltért, ezenkívül a keresztezésükből egy dihaploid térképezési populáció is rendelkezésünkre állt, mely lehetőséget adott a polimorf markerek térképezésére. A 23 felhasznált primer pár közül 12 esetében kaptunk a várt méretnek megfelelő hosszúságú PCR terméket mind 55°C, mind 60°C-os annealing hőmérsékleten. Két esetben, a *wg644* RFLP próba 3' szekvenciájához tervezett, illetve a *psr637* próba 5' szekvenciájához tervezett primerek felhasználásával kaptunk annealing polimorfizmust. A két polimorf primer párt (1. Táblázat) több ismétlésben teszteltük a különböző fagytűrésű genotípusokat tartalmazó árpa teszt gyűjteményünkön, a kapott eredmények ismételhetőségének ellenőrzésére.

A *psr637* RFLP próbához készült STS primerek felhasználásával kapott PCR termék várt mérete 282 bp volt. Ez a fragment tisztán kivehető volt a legtöbb fagytűrő árpa genotípusban, míg az érzékenyek nagy részében hiányzott (4. ábra). Az eredményeink azt mutatják, hogy a marker nem univerzális, mivel a vizsgált genotípusok esetében a PCR termék tisztán megvan a fagyérzékeny Chevalier fajtában, ezzel szemben hiányzik néhány toleránsban, melyek között őszi, ill. tavaszi jellegű genotípusok is vannak (Hamu, Bulgarian, Ventitre, Ambio, Bollo, VRH422, Turkey 166).

A *wg644* RFLP próba 3' szekvenciájához készült STS primerek felhasználásával kapott PCR termék várt mérete 215 bp volt, és a Nure, ill. Tremois fajták között annealing polimorfizmust mutatott. (4. ábra). Ennek a primer párnak a felhasználásával más fragmentek is láthatók voltak a teszt gélen, melyek egy komplex mintázatbeli polimorfizmust mutattak a különböző fagytűrésű fajták között. (4. ábra). A PCR termékek mintázata a fagytűrő genotípusok esetében egyszerűbb, mivel itt hiányzik a 215 bp-os annealing polimorfizmust mutató DNS sáv, míg egy 500 bp körüli fragment jelenléte figyelhető meg.

A fagyérzékeny genotípusoknál egy jóval komplexebb DNS mintázat figyelhető meg különböző méretű sávokkal a fagyérzékeny fajtáknál, illetve a Turkey 166-nál, ezzel szemben a Pilastro fajta, és a Pop. Scandella tájfajta a toleráns genotípusokra jellemző egyszerűbb mintázatot mutatta.

43

Kód	Genotípus	Növekedési jelleg	Fagytűrés (szántóföldi teszt)	Fagytűrés (F _v /F _m)
T1	Nure	őszi	Т	0.72
T2	Opale	őszi	Т	0.42
T3	Pastoral	őszi	Т	0.52
T4	Hamu	őszi	Т	0.59
Т5	Frost	őszi	Т	0.73
T6	Bulgarian	fakultatív	Т	0.78
T7	Ventitré	őszi	Т	0.44
T8	Alpha	őszi	Т	0.65
Т9	Ambio	őszi	Т	0.69
T10	Bollo	őszi	Т	0.69
T11	Vogelsanger Gold	őszi	Т	0.59
T12	VRH422	őszi	Т	0.57
T13	Doris	őszi	Т	0.55
T14	Yuki Shirazu	fakultatív	Т	0.74
T15	Turkey 166	fakultatív	Т	0.60
S1	Tremois	tavaszi	S	0.04
S2	Pilastro	fakultatív	S	0.15
S3	Gitane	tavaszi	S	0.03
S4	Vanja	tavaszi	S	0.07
S 5	Gunilla	tavaszi	S	0.04
S6	Apex	tavaszi	S	0.04
S7	Nemex	tavaszi	S	0.31
S8	Popolazione Scandella	tavaszi	S	0.19
S9	Chevalier	tavaszi	S	0.25
S10	Impala	tavaszi	S	0.32
S11	Volla	tavaszi	S	0.02
S12	Mona	tavaszi	S	0.11
S13	Nudinka	tavaszi	S	0.23

3. Táblázat: A vizsgálatainkban szereplő árpa genotípusok neve, növekedési jellege (őszi; tavaszi; fakultatív), fagytűrése (mesterséges besorolás a szántóföldi adatok alapján: T: fagytűrő; S: fagyérzékeny), fagytűrése kontrollált fagyasztási teszt utáni F_v/F_m értékkel jellemezve.



4. ábra: A *wg644 (fent)* és a *psr637 (lent)* RFLP markerekből készült STS próbák és az *OPA17* RAPD marker (*középen*) amplifikációs mintázata különböző fagytűrésű árpa genotípusokon (T1-T15, toleráns; S1-S13, érzékeny). A genotípusok azonosításához a kódok magyarázata a *3. Táblázatban* található. Az ábrán baloldalt vannak feltüntetve a markerek, jobboldalt a polimorf, térképezett fragmentek.

45

Az előbb említett polimorf STS markereken kívül 11 esetben megfelelő hosszúságú fragmenteket eredményezett az általunk tervezett primerekkel végzett amplifikáció, de polimorfizmust nem kaptunk a Nure és a Tremois között. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) markerek előállítása céljából elvégeztük a kapott fragmentek szekvenálását, és azt találtuk, hogy a *wg644_5* (a teljes *wg644* próba 5' vége), a *psr370f* és *psb89* RFLP próbákhoz tervezett primerek termékei között a Nure és Tremois genotípusokban restrikciós enzim felismerőhelyen szekvencia polimorfizmus volt. Elvégeztük a restrikciós emésztéseket a PCR reakció után a megfelelő enzimekkel (*Hha*I a *wg644_5* és a *psr370f*, illetve *Rsa*I a *psb89* esetében), de a poliakrilamid gélen történő elválasztás után nem kaptunk egyik esetben sem ismételhető polimorfizmust.

4.2.3. Az OPA17 RAPD marker tesztelése

Korábbi térképezési eredmények ismeretében (Pecchioni és mtsai., 2001) került sor az *OPA17* RAPD marker fagytűrő genotípusok szelektálására való alkalmasságának tesztelésére. Ez a marker polimorfizmust mutatott a Nure, és a Tremois fajták között. A 4. ábrán jól látható, hogy a marker jó hatékonysággal segít megkülönböztetni a különböző fagytűrésű genotípusokat. A fagyérzékeny genotípusokban egy 650 bp körüli fragment figyelhető meg (4. ábra), míg a toleráns genotípusoknál egy erősebb 700 bp körüli, és pár esetben egy gyengébb 750 bp körüli sáv van jelen. Hasonlóan a korábban említett STS markerekhez, az *OPA17* segítségével sem lehetett 100%-os biztonsággal elkülöníteni a fagytűrő genotípusokat a fagyérzékenyektől, mivel a toleráns Pastoral az érzékenyekhez hasonló sávot hordozza, pár fagyérzékeny genotípus (Pilastro, Scandella, Chevalier) pedig a toleráns genotípusokra jellemző 650 bp körüli fragmentet.

4.2.4. A polimorf markerek térképezése

A *psr637* STS polimorfizmust térképeztük a Nure x Tremois árpa térképezési populáción (5.ábra). A térképünkön a *psr637* RFLP próbából készített STS markert

az 5H kromoszóma hosszú karjára lokalizáltuk a Vrn-H1 lókusztól proximálisan, 16.6 cM-ra.

A wg644 RFLP próbából készült STS marker 5H(7) esetében korábbi eredmények alapján várható volt több PCR termék megléte, mivel a genomikus wg644 próbát nemcsak az 5-ös homeológ kromoszómákra térképezték Bmac0113 1.2 Wg644c gabonaféléknél, hanem a Hordeum bulbosum L. 2H^b kromoszómáján is (Salvo-Garrido és mtsai. 2001). A 45 2 Nure x Tremois populáción két fragmentet sikerült térképezni. Az elsőt (~ 500 bp; wg644c) az 5H Bmag0223 kromoszóma hosszú karjára, a centromérához közel 19.0 térképeztük, a Bmac0113 SSR markerrel szorosan OPA17 3.0 HVM62B 4.1 Psr637 kapcsoltan (1,2 cM), míg a másodikat (215 bp; *wg644b*) 10.2 a 2H kromoszómára, a Bmag0125 (12,4 cM) és az 6.4 Vrn-H1 *Ebmac0415* (27,7 cM) SSR markerek közé.

5. ábra Az általunk vizsgált és tesztelt két STS marker (wg644, ill. psr637) és az OPA17 RAPD marker térképpozíciója az 5H kromoszómán, a Nure x Tremois térképen. A markerek közötti relatív távolság a bal oldalon látható centimorganban kifejezve. A részletes, komplett térkép jelenleg publikálás alatt van (Francia et al. 2003).

Dhn1 dhn2 ABA-2 31.4 Bmag0222

Az OPA17 RAPD próba esetében a Nure, ill. Tremois között polimorfizmust mutató fragmentek közül kettőt sikerült térképeznünk, az egyiket a 6H kromoszómára, míg a másikat az 5H kromoszóma hosszú karjára, az Xpsr637-tól 7,1 cM távolságra (5.ábra).

4.3. Új tudományos eredmények

Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

- a) Új genetikai térképet hoztunk létre a búza 5B kromoszóma hosszú karjáról a Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) és a Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó térképezési populáción.
- b) Az 5B kromoszóma hosszú karjának disztális részére, az Xgwm604 SSR lókuszhoz kapcsoltan térképeztünk egy virágzási időt befolyásoló lókuszt a Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, amely valószínüleg a Vrn-B1 vernalizációs igényért felelős lókusznak felel meg.
- c) Az 5B kromoszóma hosszú karján, a centromérához közel, az Xwmc73 SSR lókuszhoz kapcsoltan térképeztünk egy virágzási időt befolyásoló lókuszt a Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, amely valószínűleg egy koraisági lókusznak (*Eps-5BL*) felel meg.
- d) A Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) térképezési populáción térképeztünk egy virágzási időt befolyásoló lókuszt az 5B kromoszóma hosszú karján az Xgwm499 SSR lókuszhoz kapcsoltan.
- e) A Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción, az 5B kromoszóma hosszú karján térképeztük az *Fr-B1* fagytűrésért felelős lókuszt, mely az *Xgwm639* SSR lókusszal kapcsolt.

PCR alapú markerek kifejlesztése fagytűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

f) A wg644_3 és a psr637 RFLP próbákat átalakítottuk PCR-alapú STS próbákká.

- g) A wg644_3 és a psr637 RFLP próbákból készült STS markerek, illetve az OPA17 RAPD marker alkalmasak – bizonyos megszorításokkal - fagytűrő és fagyérzékeny árpa genotípusok szelekciójára az általunk vizsgált 28, különböző eredetű, árpa genotípuson történt tesztelések alapján.
- h) A *psr637* STS markert és az *OPA17* RAPD markert az árpa 5H kromoszómájának hosszú karjára térképeztük, 7,1 cM távolságra egymástól.
- i) A wg644_3 STS markert a 2H kromoszómára térképeztük a *Bmag0125* (12,4 cM) és az *Ebmac0415* (27,7 cM) SSR markerek közé, ill. az 5H kromoszómán egy új pozícióba lokalizáltuk, a *Bmac0113* SSR markerrel szorosan kapcsoltan (1,2 cM).

5.KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének térképezése a búza 5B kromoszómán

Kísérleteink során két térképezési populáció felhasználásával vernalizációs igényért felelős, koraisági és fagytűrési lókuszokat térképeztünk a búza 5B kromoszómájának hosszú karján. Az általunk elkészített térképek lefedik az 5B kromoszóma hosszú karját, és a markerek sorrendje megegyezik más populációkról korábban publikált adatokkal (Röder és mtsai. 1998) (6. ábra).

Tesztelési adataink alapján térképeztünk mindkét populáción egy-egy koraisági lókuszt a centroméra közelében. Árpában már térképeztek az 5H



6. ábra Az 5B kromoszómán általunk térképezett virágzási időt és fagytűrést befolyásoló gének összehasonlító térképezése. Az ábrán látható a lehetséges homeológ kapcsolat az 5B kromoszómán elhelyezkedő vernalizációs igényért felelős *Vrn-B1* lókusz, ill. a fagytűrésért felelős *Fr-B1* lókusz, és az 5A kromoszómán levő *Vrn-A1* és *Fr-A1* között

Az ábrán balra a relatív távolságok láthatók centimorganban kifejezve.

kromoszómán hasonló pozícióba koraisági lókuszt (Laurie és mtsai. 1995), és a kolinearítás miatt várható volt búzában is koraisági lókusz megléte az 5-ös kromoszómákon a centromérához közel (Snape és mtsai. 2001). Ezenkívül Sarma és mtsai. (2000) fizikai térképezéssel két, virágzást befolyásoló, QTL-t azonosítottak az 5B kromoszómán, melyek közül az egyik a centromérához közel helyezkedett el. A két különböző populáción általunk térképezett *Eps* lókuszok pozíciói, adataink alapján különbözőek, de a kis távolság miatt valószínűleg ugyanarról a kis hatású koraisági lókuszról lehet szó.

Az 5B kromoszóma térképeinek összehasonlítása az 5A, ill. 5D kromoszómákéval bonyolult, mivel igen kevés közös marker található rajtuk, azonban a *Vrn* gének hasonló elhelyezkedése a hosszú kar disztális részén egyértelműnek tűnik. A *Vrn-B1* ugyanis szorosan kapcsolt az *Xgwm604* SSR markerrel. Bár ezt a markert nem térképezték az 5A kromoszómán (Galiba és mtsai. 1995), azonban az *Xcdo504* RFLP lókusz mind a *Vrn-A1*-gyel, mind az *Xgwm604*-gyel kapcsolt (6. ábra). Továbbá, Sarma és mtsai. (2000) a búza 5-ös homeológ kromoszómáit vizsgálták abból a szempontból, hogy azok egyes régiói, milyen rizs kromoszómákkal mutatnak hasonlóságot. Közös RFLP markerek segítségével kimutatták, hogy a *Vrn* régió az 5A, ill. az 5B kromoszóma esetén is a rizs 3-as kromoszómájával mutat homeológiát.

Az Fr gének esetében az 5A, ill. az 5B kromoszómán elfoglalt pozíciójuk között nincs olyan nagy hasonlóság, mint a Vrn géneknél. Ismét a rizzsel történő összehasonlító térképezési adatok nyújtottak segítséget a magyarázathoz (Sarma és mtsai. 2000). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az 5–ös homeológ csoport kromoszómáinak hosszú karja (a centromérához közelebb eső része) nagyfokú hasonlóságot mutat a rizs 9-es kromoszómájával. A mi esetünkben az Fr–B1 lókusz szorosan kapcsolt volt az Xgwm639 SSR lókusszal. Ez az SSR lókusz azonban kapcsoltságot mutatott az Xpsr120 RFLP lókusszal a Triticum turgidum ssp. durum, Messapia x Triticum turgidum ssp. dicoccoides, MG4343 térképen (Korzun és mtsai. 1999). Ez az RFLP lókusz az 5B kromoszóma azon régiójában helyezkedik el, amely a rizs 9-es kromoszómával mutat hasonlóságot. A Chinese

Spring-ből származó deléciós vonalak felhasználásával végzett kísérletekben Sutka és mtsai. (1999) kimutatták, hogy az Fr-AI az 5A kromoszómán szintén a rizs 9-es kromoszómájával homeológ régiót helyezkedik el, proximálisan a rizs 3-as kromoszómájával homeológ régiótól, ahol a Vrn gének találhatók. Bár a Vrn-B1 és az Fr-B1 között, az 5B kromoszóma hosszú karján, nincs meg az a szoros kapcsoltság, mint a Vrn-A1 és az Fr-A1 között az 5A kromoszómán, azonban mindkét lókusz homeoallélikusnak tűnik. A legújabb eredmények tükrében azonban nem zárható ki az a magyarázat sem, hogy az általunk térképezett Fr-B1lókusz a Vágújfalvi és mtsai. (2003) által alakorban térképezett Fr-A2-vel homeológ, mivel mindkét lókusz a kromoszóma hosszú karjának középső részén helyezkedik el. A rendelkezésre álló adatok alapján tehát az Fr-B1 homeológia viszonya nem tisztázható egyértelműen, ennek pontos megállapításához további vizsgálatok szükségesek.

Ezzel a munkával lehetővé válik a *Vrn* és *Fr* gének összehasonlító térképezése és további vizsgálata a búza 5-ös homeológ csoport kromoszómáin.

5.1.1. A kapott adatok manuális kiértékelése: színtérképezés

A számítógépes elemzés segítségével kapott eredményeket célszerűnek tartottuk manuális adatelemzéssel is ellenőrizni, melyhez hasznos eszköz a színtérképezés (Kiss és mtsai. 1998).

Az 5B kromoszóma hosszú karjának kapcsoltsági térképét színtérképezéssel is meghatároztuk, és az így kapott eredmények megerősítették a számítógépes programmal végzett analízisünket.

A fenotípusos adatok elemzése azonban rávilágított pár dologra, melyek fontosak a helyes következtetések levonásához, és a számítógépes elemzésből nem derültek ki. A virágzási idő meghatározásánál mindkét populációban megvizsgáltuk a csak az egyik, illetve csak a másik szülői genotípust mutató vonalakat, és azt találtuk, hogy az egyforma szülői genotípusú vonalak fenotípusos értékei nagy különbségeket mutattak. Mivel a vonalaink csak az 5B kromoszómára rekombinánsak, a genom többi része egyforma, így ez a jelenség csak azzal magyarázható, hogy az általunk nem térképezett rövid karon egy, vagy több nagyobb hatású, virágzást befolyásoló lókusz helyezkedhet el, mely az általunk térképezett kisebb hatású lókuszokkal együtt felelős a kapott fenotípusos értékekért. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a fenotípusos értékekben jelentős transzgresszív szegregáció mutatkozott, míg az általunk térképezett QTLek csak a fenotípusos variancia kis százalékát magyarázták. Kísérleteink során a rendelkezésünkre álló konszenzus térkép adatait felhasználva számos markert teszteltünk populációnkon az 5B kromoszóma rövid kar genetikai térképének létrehozása céljából, de a tesztelt markerek nem adtak értékelhető terméket, vagy nem mutattak polimorfizmust. A rövid kar markerekkel történő telítése segítheti ennek a kérdésnek a tisztázását.

A fagytűrési adatokkal végzett elemzés azt mutatta, hogy a -11° C, és -12° Con végzett fagyasztások adatai nem kolineárisak, mivel a -11° C-os fagyasztás még nem volt elég szelektív, a fagyérzékeny genotípusok is tolerálták, ennek ellenére a két fagyasztási hőmérséklethez tartozó QTL-eket azonos helyre térképeztük.

A színtérképezéssel nemcsak kapcsoltsági térképet tudtunk létrehozni, hanem a -12°C-os fagyasztási kísérlet adatait felhasználva, a fagytűrési lókusz pozícióját is meg tudtuk határozni. Ezt az tette lehetővé, hogy a térképezési populáció vonalainak fenotípusos eltérését csak egy lókusz okozta, így a vonalak fenotípusos értékei többé-kevésbé lépcsős eloszlást mutattak. Az 1-es bonitálási értéknél levő ugrásnál a vonalak fenotípusos értékei átalakíthatók voltak genotípusos értékekké, azaz az 1-nél nagyobb értékeket mutató vonalakat Cheyenne allélt, míg az 1-nél kisebbeket Chinese Spring allélt hordozónak feltételeztük. Ilyen módon a fagytűrési tulajdonság kromoszómális elhelyezkedése, mint egylókuszos tulajdonság, egyszerű színtérképezéssel meghatározhatóvá vált (7. ábra). Ennek a módszernek az az előnye, hogy a kapcsolt markerek és a fenotípus között a rekombinációk láthatóvá válnak, így a térképezésen alapuló klónozás is elvégezhető. A –11°C-os fagyasztás, illetve a virágzási idő adatai nem mutattak ilyen lépcsős eloszlást, így azokat nem tudtuk a fenti módon térképezni.

54

	N	34	30 20	х л –	ទ្ធ	27	36	280	29	58	5,	ي ق	л <u>с</u>	52	13	12	8 i	20	50 50	43	57	4	50	26	: 43	; 4	~	25	50	3 10	501	23	20	ŝ	ι	21	48	47 5	2 2 2	. 4	17	22	16	46 o	n ~	24	19	49	2 8	Ξ	54
Xwmc73	b	b	b k	b b	-	а	а	a a	ı a	а	а	b	a a	ı a	а	b	а	b a	a b	b	а	b	а	b a	a a	a -	а	b	b	a b	a	а	a	<mark>a</mark> t	b	а	b	b á	a a	а	b	а	b	bk	o a	ı b	b	<mark>a</mark> t	o b	а	а
Xgwm213	b	b	bk	b b	-	а	а	a a	ı a	а	а	b	a a	a a	а	b	а	b a	a b	а	а	а	а	b a	a a	a	b	b	a	a b	a	а	a	a b	b	а	b	b a	a a	а	b	а	b	bk	o b	b	b	b t	o b	а	а
Xgwm371	b	b	b k	b b	а	а	a	a a	ıа	а	b	a	a b	a	b	b	а	b a	a b	а	а	а	а	bk	o a	a a	b	b	al	b b	a	а	a	<mark>a</mark> t	b	а	b	bl	o a	а	b	а	b	bk	o b	b	b	b t	o b	а	а
Xgwm499	b	b	b k	b b	а	а	а	a a	ı a	а	b	a	a a	a a	b	b	а	b a	a b	а	а	а	а	b k	o a	a a	b	b	a	a b	b	а	a	a b	b	а	b	b I	o b	а	b	а	b	b k	o b	b	b	b t	o b	а	а
mínusz 12 C°	2,0	1,7	1,4 1	,5 2,2	0,5	0,9	0,4 (),9 0,	6 0,8	0,3	0,9	0,6 0) ,7 0,1	7 0,4	4 0,6	1,9	0,3 I	,5 0	,7 1,2	2 0,1	0,2	0,5	0,5 (0,8 1	,1 <mark>0</mark> ,1	6 0,6	2,3	0,6	0,7 0	<mark>,8</mark> 1,3	8 2,2	1,2	1,3	<mark>,7</mark> 1,	2 2,0	3,0	1,3	1,4 1	,5 2,	1 1,9	2,4	2,7	2,1	1,4 1,	,8 2,	5 1,9	2,0	1,3 -		-	-
Xgwm639	b	b	b t	b b	а	а	а	a a	ı a	а	а	a	a a	a a	а	b	а	b a	a b	а	а	а	а	a a	a a	a a	b	а	a a	a b	b	а	a	a b	a	b	b	b I	o b	b	b	b	b	b k	o b	a	b	b k	o b	а	а
Xgwm554	b	b	bb	b b	а	а	a	a a	ı a	а	а	a	a a	ı a	а	b	b	b k	b b	а	а	а	а	a a	a a	a a	b	а	a	a a	b	а	a	b b	a	b	b	b I	o b	b	b	b	b	bk	o b	a	а	b k	o b	а	а
Xgwm408	b	b	bk	b b	а	а	а	a a	ı a	b	а	a	b a	a b	а	b	а	a k	o a	а	b	а	b	b a	a b) b	b	b	a a	a a	а	а	a	b a	a	а	а	b I	o a	b	b	а	b	<mark>a</mark> k	o b	a	а	a a	a b	а	b
Xgwm604	b	b	b t	b b	а	а	a	a a	ı a	а	b	a	a a	ı a	b	а	а	a a	a a	а	а	а	-	bb	o b) b	b	b	a a	a a	а	а	a	b a	ı a	b	а	a I	o a	а	b	b	b	a k	o b	a	а	a a	a b	b	а
Xwmc235	b	b	bb	b b	а	а	а	a a	ı a	а	а	a	a a	a a	а	а	а	a t	o a	а	а	а	-	b a	a b	b	b	b	a	a a	а	а	a	b a	a	b	а	a I	o a	а	а	b	а	a a	a b	a	а	b a	a a	b	а

7. ábra: Az 5B kromoszóma hosszú karjának színtérképe a Chinese Spring x Chinese Spring(Cheyenne 5B) keresztezésből származó térképezési populáción. Baloldalt láthatók az egyes markerek, a felső sorban pedig a térképezési populáció vonalai. Világos színnel és "a" betűvel vannak jelölve a Chinese Spring allélek, sötét színnel és "b" betűvel a Cheyenne allélek. Az ábrán láthatók a –12°C-os fagyasztási kísérlet eredményei, az egyes értékek az adott vonal bonitálási értékei. A többé-kevésbé lépcsős eloszlás alapján az 1-nél kisebb bonitálási értékete mutató vonalak Chinese Spring típusúak, míg az 1-nél nagyobb bonitálási értékűek Cheyenne típusúak. Ezzel a módszerrel a fagytűrési tulajdonság elhelyezkedése egy génes színtérképezéssel meghatározható.

5.2. PCR alapú markerek kifejlesztése, tesztelése, és térképezése fagytűrő genotípusok szelekciójára árpa 5H kromoszómán

5.2.1. STS markerek kifejlesztése RFLP markerekből

Vizsgálataink során búzában és árpában a fagytűrésben kulcsszerepet játszó 5A, illetve 5H kromoszóma hosszú karjára térképezett RFLP markerekkel dolgoztunk, hogy azokat PCR-alapú markerekké alakítva lehetővé tegyük felhasználásukat fagytűrő árpa genotípusok gyors, egyszerű és olcsó szelektálására. Kísérleteinket 16 RFLP markerrel végeztük, és azok szekvenciái ismeretében 23 primer párt teszteltünk két, fagytűrésében karakterisztikusan eltérő, árpa genotípuson (Nure, illetve Tremois). A 23 primer párból 12 felhasználásával kaptunk várt hosszúságú terméket, melyek közül 2 (8,7%) mutatott annealing polimorfizmust. A polimorf STS markereket 28 különböző fagytűrésű árpa genotípuson teszteltük (15 fagytűrő, illetve 13 fagyérzékeny).

A jó amplifikációt mutató, de nem polimorf terméket eredményező primerekből kísérletet tettünk CAPS markerek előállítására is, és a PCR termékek szekvencia analízise alapján 3 primer pár PCR termékeit emésztettük restrikciós enzimekkel, azonban az ezt követő poliakrilamid gélelektroforézis után nem találtunk ismételhető polimorfizmust.

A *psr637* RFLP próbából készült STS marker felhasználásával jó hatékonysággal lehetett különbséget tenni a fagytűrő és a fagyérzékeny árpa genotípusok között. A *psr637* RFLP markert az *Fr-Vrn* régiótól proximálisan térképezték búzában (Galiba és mtsai 1995), a belőle készített STS markert hasonló pozícióba lokalizáltuk mi is, ami jelzi az eredeti RFLP marker és a belőle készült PCR marker hasonló genetikai viselkedését. A marker *Fr-Vrn* régiótól lévő távolsága azonban nem magyarázza a fagytűrő és fagyérzékeny genotípusok közötti eltérő mintázatot. Olasz partnerünkkel közösen szántóföldi télállósági kísérleteket, és növénynevelő kamrában végzett fagyasztási teszteléseket is végeztünk fagytűrési QTL-ek térképezése céljából a Nure x Tremois populáción (Francia és mtsai., publikálás alatt). Az itt kapott új adatok ismertetését ebben a

dolgozatban szükségesnek tartjuk a kapott eredményeink könnyebb értelmezése és magyarázata miatt, azonban ezek az adatok nem tartoznak a disszertáció új tudományos eredményei közé. Az 5H kromoszómán a télállósági adatokkal végzett QTL analízist követően egy új fagytűrési QTL-t azonosítottunk a *psr637* STS markertől 7,6 cM-ra, míg a növénynevelő kamrában végzett fagyasztási teszt adataival végzett QTL analízis a *psr637*-től 9,9 cM távolságra adott szignifikáns QTL-t. Mivel az újonnan térképezett télállósági, illetve fagytűrési QTL kis távolságra helyezkedik el ettől a markertől, ez logikus magyarázatnak tűnik a különböző fagytűrésű genotípusok közötti eltérő mintázatra, és ez a távolság magyarázza az azonos fagytűrési jellegű genotípusok között meglevő kivételeket is, a marker és a fagytűrési tulajdonságért felelős lókusz közt esetlegesen fellépő rekombináció miatt.

A wg644 RFLP próbából készült STS marker esetében nem ilyen egyszerű a helyzet. Az általunk térképezett polimorfizmusok közül a 2H kromoszómára térképezett lókusz minden bizonnyal megegyezik a Salvo-Garrido és mtsai. (2001) által Hordeum bulbosum-ban térképezett Xwg644 RFLP lókusszal. Azonban ez nem magyarázza az STS marker használatakor a fagytűrő és fagyérzékeny genotípusok közötti különbséget, mivel a 2H kromoszómán eddig nem térképeztek fagytűrési QTL-t. Az általunk térképezett másik polimorfizmust az 5H kromoszómára lokalizáltuk, azonban a nagy távolság miatt kizárt, hogy ez a lókusz azonos legyen a korábban közölt (Heun és mtsai. 1991; Galiba és mtsai. 1995) wg644 RFLP marker pozíciójával. Mivel az STS marker mintázata és polimorfizmusa a teszteléshez használt árpa genotípus gyűjteményen, és a térképezési populáción is jó reprodukálhatóságot mutatott, valószínűnek tartjuk, hogy a wg644 markernek egy, eddig még nem közölt, új lókuszát azonosítottuk. Az a tény, hogy a wg644 STS marker különböző mintázatot mutatott a fagytűrő és fagyérzékeny genotípusokban, nehezen magyarázható, mivel az általunk végzett QTL analízis nem eredményezett fagytűréssel kapcsolatba hozható hatást az 5H kromoszómának ebben a régiójában, és korábbi irodalmi adatok sem utalnak arra, hogy az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak ebben a régiójában fagytűrési lókuszok lennének. Lehetségesnek tartjuk, hogy a korábban az *Fr-Vrn* régióba térképezett eredeti RFLP markernek megfelelő fragmentumok nem mutattak polimorfizmust a rendelkezésünkre álló térképezési populáció szülői között, így térképezni sem tudtuk, de a fagyérzékeny genotípusokban meglévő, nem térképezett, fragmentek valamelyikével azonosak lehetnek. Ennek hipotézisnek a bizonyítását a fragmentumok direkt szekvenálásával, illetve a fragmentek másik térképezési populáción történő szegregációs analízisével tervezzük elvégezni.

A wg644 RFLP próba további vizsgálata árpában és búzában új PCR-alapú markerek létrehozására továbbra is indokolt, mivel ebből a markerből már sikerült korábban PCR alapú markereket kifejleszteni búzában, és segítségükkel az 5B kromoszómájukon Vrn-B1 allélt hordozó őszi genotípusokat szelektálni (Iwaki és mtsai., 2002). Az általuk vizsgált RFLP markerek közül három (*psr426, bcd450, wg644*) a mi kísérleteinkben is szerepelt, és mindkét esetben a *wg644* mutatott jól felhasználható polimorfizmust, bár az általunk tervezett primerek semmiféle homológiát nem mutattak az Iwaki és mtsai. (2002) által kifejlesztettekkel.

5.2.2. Egyéb szelekcióra használható PCR-alapú markerek: OPA17 RAPD marker

Az OPA17 RAPD marker kiválasztása a tesztelésre Pecchioni és mtsai. (2001) előzetes eredményei alapján került sor, más adatokat nem ismertünk ennek a markernek a pozíciójára vonatkozóan árpában. A RAPD marker 3 jól ismételhető polimorf fragmentumot adott. Ennek ellenére hasznosnak véljük az OPA17-ből SCAR markerek létrehozását, melyhez az első lépések már megtörténtek, hogy specifikusan lehessen felszaporítani az OPA17 felhasználásával kapott 3 polimorf fragmentet. A szántóföldi kísérlet adataival, és a növénynevelő kamrában végzett fagyasztási kísérlet adataival elvégzett összetett intervallum térképezéssel két lókuszt találtunk az 5H kromoszóma hosszú karján amely kapcsolatba hozható a fagytűréssel. Ezek közül az egyik a *cbf1-OPA17a* intervallumra (4,1 cM) esett, és a fenotípusos variancia 46%-áért felelős 13,4-es LOD értékkel. A fagytűrésért felelős allélt a Nure hordozta. A fagytűrési és télállósági QTL-ek szoros kapcsoltságot

mutattak az *OPA17*-tel, mivel 2,8 cM, illetve 0,5 cM távolságra helyezkedett el a QTL maximuma ettől a RAPD markertől. A QTL-ek kapcsoltsága a *cbf1* lókuszhoz azért érdekes a mi szempontunkból, mivel a *cbf1* gén tűnik az egyik lehetséges fagytűrési regulátornak árpában (Xue 2002).

A vizsgált markerek közül az *OPA17* tűnik a legígéretesebbnek, mivel az általunk térképezett fagytűrési QTL a *cbf1-OPA17a* intervallumra esett.

Árpában ez a munka az első, fagytűrő genotípusok szelektálására alkalmas felhasználóbarát PCR-alapú markerek kifejlesztésére. Egy lépéses PCR reakcióval, restrikciós emésztés, és hibridizációs lépés nélkül egy nemesítési programban a toleráns genotípusok szelektálhatók. A három, általunk vizsgált marker, függetlenül a növekedési jellegtől, úgy tűnik alkalmas a vizsgált genotípusokban az 5H kromoszómához kötött fagytűrési tulajdonság nyomon követésére, bár a vizsgált markerek további tesztelése egy nagyobb genotípus kollekción, illetve nemesítési vonalak bevonása a vizsgálatokba további értékes információkat adhatnak a nemesítésben történő felhasználhatóságukról. A három polimorf marker közül egyik sem bizonyult univerzálisnak, egyes fagytűrő, és fagyérzékeny genotípusok egyaránt hordoztak ellentétes marker alléleket, azonban egy keresztezési programban a három marker együttes alkalmazása, illetve a legmegfelelőbb felhasználása segítséget nyújthat a kívánt fagytűrési tulajdonság szegregációjának nyomon követésére. A fagytűrés komplex, mennyiségi tulajdonság, és a toleranciát több gén együttes hatása okozza, az azonban bizonyított, hogy az 5H kromoszóma szerepe a fagytűrésben kulcsfontosságú (Hayes és mtsai. 1993; Pan és mtsai. 1994; Cattivelli és mtsai. 2002), így az ide térképezett markerek alkalmasak lehetnek az 5H kromoszóma fagytűrésért felelős régióinak nyomon követésére.

6. Összefoglalás

Munkánk során két, egy kromoszómára rekombináns, populáción végeztük el a búza 5B kromoszómán található virágzási időt befolyásoló lókuszok térképezését, és az egyik populációt felhasználtuk fagytűrési lókusz térképezésére is. Az 5B kromoszóma genetikai térképeit főként mikroszatellit és kisebb részben RFLP markerek felhasználásával állítottuk össze. A két genetikai térkép a közös markerek miatt jól összehasonlítható, és egyezést mutat korábban publikált térképekkel. A QTL analízist az egyes populációk növénynevelő kamrákban elvégzett virágzási, és fagyasztási tesztjeiből származó fenotípusos adatokkal végeztük. A CS x CS (Cheyenne 5B) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési populáción térképeztük a Vrn-B1 lókuszt, amely vernalizációs válaszért felelős, az Eps-5BL koraisági lókuszt, és az Fr-B1 fagytűrésért felelős lókusztt. A Hobbit x Hobbit (Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési szintén egy koraisági lókuszt térképeztünk. A Vrn-B1 az 5B kromoszóma hosszú karjának disztális részén helyezkedett el, amely régió szintenikus az 5A, illetve az 5D kromoszóma Vrn-A1-et, illetve Vrn-D1-et hordozó szakaszával. A két, különböző populáción térképezett, koraisági lókusz a centromérához közel helyezkedett el 16 cM távolságra egymástól, és pozíciójuk homeológ egy, árpában már térképezett, koraisági lókusszal, és búzában a Chinese Spring deléciós vonalak segítségével fizikailag térképezett, feltételezett koraisági lókusszal. Az Fr-B1 lókuszt az 5B kromoszóma hosszú karjára térképeztük, 40 cM távolságra a centromérát jelző markertől. Korábbi, rizzsel végzett, összehasonlító térképezési adatok alapján úgy tűnik, hogy ez a gén ortológ az 5A, és 5D kromoszómán térképezett Fr génekkel, mégha pozíciója proximálisabb is, de nem zárható ki az alakorban térképezett Fr-A2-vel való ortológia sem. Munkánkkal teljessé vált a vernalizációs igényért felelős, és fagytűrési lókuszok homeoallélikus sorozatának térképezése az 5-ös homeológ csoport kromoszómáinak hosszú karján búzában.

A fagytűrés nagyon fontos tulajdonsága az árpának, ezért az új fajták létrehozásánál a fő szempontok közé tartozik az alacsony hőmérséklet túlélésére való képesség. A nemesítők kezében fontos eszközként szolgálhatnak olyan PCRalapú markerek, melyek segítségével gyorsan és egyszerűen lehetne szelektálni a fagytűrő genotípusokat. Kísérleteink során kifejlesztettünk, teszteltünk, illetve térképeztünk 3 PCR-alapú markert (két STS markert a wg644, illetve psr637 RFLP próbákból, és az OPA17 RAPD markert) melyek alkalmasak fagytűrő árpa genotípusok szelektálására. Bár az általunk vizsgált markerek nem univerzálisak, de jó hatékonysággal tettek különbséget a fagytűrő, és fagyérzékeny genotípusok között. A markerek térképezését a Nure és a Tremois árpafajták keresztezéséből származó dihaploid populáción végeztük. A psr637 és az OPA17 markereket az 5H kromoszóma hosszú karjára, egy fagytűrési QTL-hez kapcsoltan térképeztük, a wg644-et pedig a 2H kromoszómára, illetve az 5H kromoszómán, egy eddig nem ismert pozícióban, a centromérához közel lokalizáltuk. E három PCR-alapú marker nemesítésben történő felhasználása felgyorsíthatja a fagytűrő árpa genotípusok szelekcióját, és csökkentheti az alacsony hőmérsékletek túlélésére képes fajták előállításának költségeit.

SUMMARY

Two populations of single chromosome recombinant lines were used to map genes controlling flowering time on chromosome 5B of wheat, and one of the populations was also used to map a new frost resistance gene. Genetic maps were developed, mainly using microsatellite markers, and QTL analysis was applied to phenotypic data on the performance of each population collected from growthroom tests of flowering time and frost tolerance. Using a recombinant substitutionline mapping population derived from a cross between the substitution-line 'Chinese Spring' (CS) and 'Chinese Spring' ('Cheyenne' 5B), the locus Vrn-B1, affecting vernalization response, an earliness per se locus, Eps-5BL, and the locus, Fr-B1, affecting frost resistance, were mapped. Using a 'Hobbit' x 'Hobbit' ('Chinese Spring' 5BL) recombinant substitution line mapping population, also an earliness per se locus was mapped. The Vrn-B1 locus was mapped on the distal portion of the long arm of chromosome 5B, to a region syntenous with the segments of chromosomes 5A and 5D containing Vrn-A1 and Vrn-D1 loci, respectively. The two Eps-5BL loci were mapped close to the centromere with a 16-cM distance from each other, one in agreement with the position of a homoeologous locus previously mapped on chromosome 5H of barley, and suggested by the response of 'Chinese Spring' deletion lines. The Fr-B1 locus was mapped on the long arm of chromosome 5B, 40 cM from the centromeric marker. Previous comparative mapping data with rice chromosome 9 would suggest that this gene could be orthologous to the other Fr genes mapped previously by us on chromosomes 5A or 5D of wheat, although in a more proximal position, but the orthology with the locus Fr-A2 recently mapped in Triticum monococcum can not be excluded. This study completes the mapping of these homoeoallelic series of vernalization requirement genes and frost resistance genes on the long arm of the chromosomes of the homoeologous group 5 in wheat.

Frost tolerance is an important trait for winter barley breeding. Field selection for this trait is not always efficient since, especially in Southern Europe, severe winter frost is an erratic event. Recent advances in terms of cloned genes and of molecular markers in barley can give to molecular breeders the necessary informations for the development of new, simple PCR-based molecular markers that can be important tools to select quickly the frost tolerant genotypes. We report here the development of three PCR-based markers, two STS markers, derived from the wg644 and psr637 RFLP probes, and one RAPD, OPA17, chosen for their location on chromosome 5H, where most important loci for frost tolerance had been previously mapped. They were validated on a set of winter and spring barley genotypes with different levels of frost tolerance. The efficiency of the developed markers to separate the frost tolerant and susceptible genotypes was clear, with some exceptions. In the 'Nure' x 'Tremois' barley map, based on a segregating population of doubled haploid lines, the psr637 STS and the OPA17 RAPD were mapped on the long arm of chromosome 5H, close to a frost tolerance QTL. The wg644 STS yielded several polymorphisms across the germplasm of tolerant vs. susceptible genotypes, and two polymorphic bands could be located in the 'Nure' x 'Tremois' map on chromosomes 5H and 2H, but none of them was mapped to position of 5H expected from colinearity observations.

The utilization of these three PCR-based markers can speed up the selection of frost tolerant barley genotypes and decrease the costs of the development of cultivars surviving low temperatures.

IRODALOMJEGYZÉK

- Allard RW (1956) Formulas and tables facilitate the calculation of recombination values in heredity. Hilgardia 24:235-278
- Baldi P, Grossi M, Pecchioni N, Vale G and Cattivelli L (1999) High expression level of a gene coding for a chloroplastic amino acid selective channel protein is correlated to cold acclimation in cereals. Plant Mol Biol 41: 233-243.
- Botstein D, White RL, Skolnik M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314-331
- Boyko E, Kalendar R, Korzun V, Fellers J, Korol A, Schulman AH, Gill BS (2002)
 A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function. Plant Mol Biol 48: 767-790
- Brahm L, Röcher T and Friedt W (2000) PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. Crop Sci 40: 676-682.
- Briney A, Wilson R, Potter RH, Barclay I, Crosbie G, Appels R and Jones MGK (1998) A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat. Mol Breed 4: 427-433.
- Burr B, Evola SV, Burr FA, Beckmann JS (1983) The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: Genetic engineering: Principles and methods, Vol. 5 J.K. Setlow and A. Hollaender, eds, Plenum Press, New York, 45-59
- Butler WL, Kitajima M, (1975) Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplast. Biochim Biophys Acta 376: 116-125
- Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Grossi M, Vale G and Stanca AM (1999) Genetic bases of barley physiological response to stressful conditions. In: Barley

Science: recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality (G.A. Slafer Ed.) Special Issue of The Journal of Crop Production published by Food Product Press, New York, USA.

- Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Di Fonzo N, Faccioli P, Grossi M, Mastrangelo AM, Pecchioni N, Stanca AM (2002) Chromosome regions and stressrelated sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticae*. Plant Mol Biol 48:649-665
- Chao SP, Sharp PJ, Worland AJ, Warham EJ, Koebner RMD, Gale MD (1989) RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. Theor Appl Genet 78:493-504
- Choi D-W, Rodriguez EM and Close TJ (2002) Barley *Cbf3* gene identification, expression pattern, and map location. Plant Physiol. 129: 1-7.
- Condit R, Hubell SP (1991) Abundance and DNA sequence of two-based repeat regions in tropical tree genomes. Genome 34:66-71
- Decousset L, Griffiths S, Dunford RP, Pratchett N and Laurie DA (2000) Development of STS markers closely linked to the *Ppd-H1* photoperiod response gene of barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet 101: 1202-1206.
- Devos KM, Gale MD (1993) Extended genetic maps of the homoeologous group 3 of wheat, rye and barley. Theor Appl Genet 85:649-652
- Dubcovsky J, Luo MC, Zong GY, Bransteiter R, Desai A, Kilian A, Kleinhofs A and Dvorak J (1996) Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum*L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. Genetics 143: 983-999.
- Dubcovsky J, Lijavetzky D, Appendino L and Tranquilli G (1998) Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. Theor Appl Genet 97: 968-975.
- Dubcovsky J, Ramakrishna W, SanMiguel PJ, Busso CS, Yan L, Shiloff BA and Bennetzen JL (2001) Comparative sequence analysis of colinear barley and rice bacterial artificial chromosomes. Plant Physiol 125: 1342-1353

- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, Stanca AM, Galiba G, Tóth B, Hayes PM, Skinner J, Pecchioni N (2003) Two loci on chromosome 5H(7) are responsible for frost tolerance in the 'winter' x 'spring' ('Nure' x 'Tremois') barley cross. Theor Appl Genet: Közlésre elfogadva
- Fowler DB, Limin AE, Ritchie JT (1999) Low-temperature tolerance in cerealsmodel and genetic interpretation. Crop Sci 39: 626-633
- Gale MD, Devos KM (1998) Comparative genetics in the grasses. Proc Natl Acad Sci 95: 1971-1974
- Galiba G, Sutka J (1988) A genetic study of frost resistance in wheat callus culture. Plant Breed 101:132-136
- Galiba G, Quarrie SA, Sutka J, Morgounov A, Snape JW (1995) RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. Theor Appl Genet 90:1174-1179
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Boyko EV (1996) Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. Genetics 143(2):1001-1012.
- Graner A, Jahoor A, Schondelmaier J, Siedler H, Pillen F, Fischbeck G, Wenzel G, Herrmann RG (1991) Construction of RFLP map of barley. Theor Appl Genet 83:250-256
- Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breeding 118:369-390
- Haldane JBS (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. J Genet 8:299-309
- Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses with flanking markers. Heredity 69: 315-324
- Hayes PM, Blaket T, Chen THH, Tragoonrung S, Chen S, Pan A and Liu B (1993)Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winter hardiness. Genome 36: 66-71.

- Heun M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrels ME, Tanksley SD (1991) Construction of restriction fragment length polymorphism map for barley (Hordeum vulgare). Proc Natl Acad Sci USA 88:3691-3695
- Houde M, Rajinder SD and Sarhan F (1992) A molecular marker to select for freezing tolerance in *Gramineae*. Mol Gen Genet 234: 43-48.
- Iwaki K, Nishida J, Yanagisawa T, Yoshida H and Kato K (2002) Genetic analysis of *Vrn-B1* for vernalization requirement by using linked dCAPS markers in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 104: 571-576
- Jansen RC (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics 135:205-211
- Jansen RC (1994) Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. Genetics 138:871-881
- Jansen RC, Stam P (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136:1447-1455
- Kaló P (2000) Géntérképezés, a genetikai kapcsoltság kimutatása. Növénytermelés 49, 5:707-719
- Karsai I, Mészáros K, Hayes PM, Bedő Z (1997) Effects of loci on chromosomes
 2(2H) and 7(5H) on developmental patterns in barley (*Hordeum vulgare*L.) under different photoperiod regimes. Theor Appl Genet 94:612-618
- Kato K, Miura H and Sawada S (1999) Comparative mapping of the wheat *Vrn-A1* region with the rice *Hd-6* region. Genome 42: 204-209
- Kearsey MJ, Hyne V (1994) QTL anaysis : a simple marker regression approach. Theor Appl Genet 89: 698-702
- Kiss GB, Kereszt A, Kiss P, Endre G (1998) Colormapping: a non-mathematical procedure for genetic mapping. Acta Biologica Hungarica 49:47-64
- Kiss GB, Endre G (1999) Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. Szemelvények a növényi molekuláris biológiából 57-71. (Szerk. Balázs Ervin és Dudits Dénes, Akadémiai Kiadó)
- Kleinhofs A, Killian A, Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Hayes P, Chen FQ, Lapitan N, Fenwick A, Blake TK, Kanazin V, Ananiev E, Dahleen L,

Kudrna D, Bollinger D, Knapp SJ, Liu B, Sorrels M, Heun M, Franckowiak JD, Hoffmann D, Skadsen R and Steffenson BJ (1993) A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. Theor Appl Genet 86: 705-712

- Knott SA, Haley CS (1992) Aspects of maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci. Genet Res Camb 60:139-151
- Koebner RMD, Summers RW (2003) 21st century wheat breeding: plot selection or plate detection? Trends Biotech 21(2): 59-63
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. Ann Eugen 12:172-175
- Korzun V, Röder M, Worland AJ, Börner A (1997) Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. Plant Breeding 116:227-232
- Korzun V, Roder MS, Wendehake K, Pasqualone A, Lotti C, Ganal MW, Blanco A (1999) Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid bread wheat into a genetic linkage map of durum wheat. Theor Appl Genet 98:1202-1207
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE and Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for construction primary genetic linkage maps of experimental and natural population. Genomics. 1: 174-181
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199
- Laurie DA, Pratchett N, Bezant J, Snape JW (1995) RFLP mapping of five major genes and eight quantitative trait loci controlling flowering time in winter x spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. Genome 38:575-585
- Laurie DA (1997) Comparative genetics of flowerig time. Plant Mol Biol. 35: 167-177
- Law CN (1966) The location of genetic factors affecting a quantitative character in wheat. Genetics 53: 487-498

- Law CN, Jenkins G (1970) A genetic study of cold resistance in wheat. Genet Res 15:197-208
- Law CN, Worland AJ, Giorgi B (1976) The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat. Heredity 36: 49-58
- Law CN, Snape JW, Worland AJ (1981) Intraspecific chromosome manipulation. Philos Trans R Soc London Ser B 292: 509-518
- Law CN, Dean C, Coupland G (1991) Genes controlling flowering and strategies for their isolation and characterisation. p. 47-68. In:Jordan B (ed), The Molecular Biology of Flowering. CAB International
- Limin AE, Fowler DB (2002) Developmental traits affecting low-temperature tolerance response in near-isogenic lines for the Vernalization locus Vrn-A1 in wheat (Triticum aestivum L. em Thell). Annals of Botany 89: 579-585
- Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. Proc Natl Acad Sci USA 45:753-763
- Martinez O, Curnow RN (1992) Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. Theor Appl Genet 85:480-488
- McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, Gale MD, Rogers WJ (1998) Catalogue of gene symbols for wheat. Proc 9th Int Wheat Genet Symp., Saskatoon, Saskatchewan, Canada, Edited by AE Sünkard, University Extension Press, University of Saskatchewan, pp. 1-235
- Mohan M, Nair S, Bentur JS, Rao UP, Benett J (1994) RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm2* gene that confers resistance to biotype 1 of gall midge (*Orseolia oryzae*). Theor Appl Genet 87: 782-788
- Morgan TH (1910) Sex limited inheritance in Drosophila. Science 32:120
- Morgante MG, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J 3:175-182
- Nagy I (1999) Továbbfejlesztett PCR-alapú polimorfizmus-vizsgálati technikák. Növénytermelés 48:421-434

- Nelson JC, Sorrells ME, Deynze AE van, Lu-YunHai, Atkinson M, Bernard M, Leroy P, Faris JD, Anderson JA, Van Deynze AE, Lu YH (1995):
 Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. Genetics 141: 721–731
- Pan A, Hayes PM, Chen F, Chen HHT, Blake T, Wright S, Karsai I and Bedő Z (1994) Genetic analysis of the components of winter hardiness in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet. 89: 900-910
- Parker GD and Langridge P (2000) Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). Mol Breed 6: 169-174
- Parodi PC, Nyquist WE, Patterson FL, Hodges HF (1983) Traditional combining ability and Gardner-Eberhart analyses of a diallel for cold resistance in winter wheat. Crop Sci 23: 314-318
- Pecchioni N, Francia E, Arru L, Baldi P, Cattivelli L, Gianinetti A and Stanca AM (2001) Development of a 'winter' x 'spring' and 'feeding' x 'malting' tworowed barley map. Plant & Animal Genome IX Conference Town & Country Hotel, San Diego, CA, January 13-17
- Plaschke J, Korzun V, Koebner RMD, Schlegel R, Gale MD (1993) RFLP mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. Theor Appl Genet 85:1049-1054
- Plaschke J, Ganal MW, Röder M (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor Appl Genet 91:1001-1007
- Puchkov YM, Zhirov EG (1978) Breeding of common wheat varietes with a high frost resistance and genetic aspects of it. World Sci News, India 15:17-22
- Rigin BV, Barashkova EA (1984) Genetic analyis of resistance to frost in the variety Mironovskaya 808 with the use of Chinese Spring aneuploid. Sel Genet Charac Sort Pshen 85: 23-29

- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. Genetics 125:645-654
- Rizza F, Crosatti C, Stanca AM and Cattivelli L (1994) Studies for assessing the influence of hardening on cold tolerance of barley genotypes. Euphytica. 75: 131-138
- Rizza F, Pagani D, Stanca AM and Cattivelli L (2001) Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. Plant Breeding. 10: 389-396
- Roberts DWA (1986) Chromosomes in 'Cadet' and 'Rescue' wheats carrying loci for cold hardiness, and vernalization response. Can J Genet Cytol 28:991-997
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007-2023
- Salvo-Garrido H, Laurie DA, Jaffe B and Snape JW (2001) An RFLP map of diploid *Hordeum bulbosum* L. and comparison with maps of barley (*H. vulgare* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) Theor Appl Genet 103: 869-880
- Sarma RN, Gill BS, Sasaki T, Galiba G, Sutka J, Laurie DA and Snape JW (1998) Comparative mapping of the wheat chromosome 5A Vrn-A1 region with rice and its relationship to QTL for flowering time. Theor Appl Genet 97: 103-109
- Sarma RN, Fish L, Gill BS, Snape JW (2000) Physical characterization of the homoeologous group 5 chromosomes of wheat in terms of rice linkage blocks, and physical mapping of some important genes. Genome 43:191-198
- Shah MM, Gill KS, Baenziger PS, Yen Y, Kaeppler SM Ariyarathne HM (1999) Molecular mapping of loci for agronomic traits on chromosome 3A of bread wheat. Crop Science 39:1728-1732
- Snape JW, Law CN, Parker BB, Worland AJ (1985) Genetic analysis of chromosome 5A of wheat and its influence on important characters. Theor Appl Genet 71: 518-526
- Snape JW, Semikhodskii A, Fish L, Sarma RN, Quarrie SA, Galiba G, Sutka J (1997) Mapping frost resistance loci in wheat and comparative mapping with other cereals. Acta Agron Hung 45:265-270
- Snape JW, Butterworth K, Whitechurch E, Worland AJ (2001) Waiting for fine times: genetics of flowering time in wheat. Euphytica 119:185-190
- Soller M, Brody T, Genizi A (1976) On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. Theor Appl Genet 47:35-39
- Stam P (1991) Some aspects of QTL analysis. In: Pesek J, Hartmann J (eds) Biometrics in plant breeding. Proc 8th Meet of the Eucarpia section, Biometrics in plant breeding 1-6 July 1991, Brno, Czechoslovakia
- Stam P (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant J 5:739-744
- Storlie EW, Allan RE, Walker-Simmons MK (1998) Effect of the Vrn1-Fr1 interval on cold hardiness level of near-isogenic wheat lines. Crop Sci. 38: 483-488.
- Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in Drosophila, as shown by their mode of association. J Exp Zool 14:203-204
- Sutka J (1981) Genetic studies of frost resistance in wheat. Theor Appl Genet 59:145-152
- Sutka J (1984) A ten-parental diallel analysis of frost resistance in winter wheat. Z Pflanzenzuecht 93: 147-157
- Sutka J and Snape JW (1989) Location of a gene for frost resistance on chromosome 5A of wheat. Euphytica 42: 41-44
- Sutka J (1994) Genetic control of frost tolerance in wheat (Triticum aestivum L.). Euphytica. 77: 277-282

- Sutka J, Galiba G, Vágújfalvi A, Gill B S, Snape J W (1999) Physical mapping of the Vrn-A1 and Fr1 genes on chromosome 5A using deletion lines. Theor Appl Genet 99 : 199-202
- Takahashi R, Yasuda S (1970) Genetics of earliness and growth habit in barley.p. 388-408. In: Nilan, RA (ed) Barley Genetics II Proc 2nd Int Barley Genet Symp, Pullman, WA. 1970 Washington State University Press.
- Tanksley SD, Ganal MW, Prince JP, Devicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132(4): 1141-1160
- Vágújfalvi A, Crosatti C, Galiba G, Dubcovsky J and Cattivelli L (2000) Two loci on wheat chromosome 5A regulate the differential cold-dependent expression of the cor14b gene in frost-tolerant and frost-sensitive genotypes. Mol Gen Genet. 263: 194-200
- Vágújfalvi A, Galiba G, Cattivelli L, Dubcovsky J (2003) The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A. Mol Genet Genomics 269(1): 60-67
- Van Deynze AE, Nelson JC, O'Donoughue LS, Ahn SN, Siripoonwiwat W, Harrington SE, Yglesias ES, Braga DP, McCouch SR and Sorrells ME 1995 Comparative mapping in grasses. Oat relationships. Mol Gen Genet. 249(3): 349-356
- Veisz O, Sutka J (1989) The relationships of hardening period and expression of frost resistance in chromosome substitution lines of wheat. Euphytica 43:41-45
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl Acids Res 23:4407-4414
- Weber JL (1990) Informativness of human (dC-dA)n-(dG-dT)n polymorphisms. Genomics 7:524-530

- Weising K, Beyermann B, Ramser J, Kahl G (1991) Plant DANN-fingerprinting with radioactive and digoxygenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. Electrophoresis 12:159-169
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res 18:7213-7218
- Wicker T, Stein N, Albar L, Feuillet C, Schlagenhauf E, Keller B (2001) Analysis of a contiguous 211 kb sequence in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) reveals multiple mechanisms of genome evolution. Plant J 26(3): 307-316
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KL, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18:6531-6535
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003) Positional cloning of the vernalization gene VRN1. Proc Natl Acad Sci 100(10):6263-6268
- Xue GP (2002) An AP2 domain transcription factor HvCBF1 activates expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a (G/a)(C/t)CGAC motif. Biochim Biophys Acta 1577(1):63-72
- Zeng Z-B (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136:1457-1468
- Zhang W, Zheng Y, Foote T, Doldersum J, Dunford R, Fish L, Wang Y, Moore G, Snape JW (1998) Mapping key genes on chromosome 5B of wheat. John Innes Centre & Sainsbury Centre Annual Report 1997/98 pp12

Függelék

I. Táblázat: A Chinese Spring x Chinese Spring(Cheyenne 5B) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési populáción kapott markerezési adatok. Baloldalt láthatók az egyes SSR markerek, a felső sorban pedig az egyes vonalak. Legalul láthatók a szülői adatok. Genotípusok

										Gen	oup	usor	`										
Markerek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Xwmc73	b	b	b	а	а	b	а	а	b	b	а	b	а	а	а	b	b	b	b	а	а	а	а
Xgwm213	b	b	b	а	а	b	b	b	b	b	а	b	а	а	а	b	b	b	b	а	а	а	а
Xgwm371	b	b	b	а	а	b	b	b	а	b	а	b	b	b	b	b	b	b	b	а	а	а	а
Xgwm499	b	b	b	b	b	b	b	b	а	b	а	b	b	b	b	b	b	b	b	а	а	а	а
Xgwm639	b	b	а	b	b	b	b	b	а	b	а	b	а	а	а	b	b	b	b	а	b	b	а
Xgwm554	b	b	а	b	b	b	b	b	а	а	а	b	а	а	а	b	b	b	а	а	b	b	а
Xgwm408	b	b	а	а	а	b	b	b	а	а	а	b	а	а	а	b	b	b	а	а	а	а	а
Xgwm604	b	b	а	а	а	b	b	b	а	а	b	а	b	b	b	b	b	b	а	а	b	b	а
Xwmc235	b	b	а	а	а	а	b	b	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b	b	а
									(Gen	otíp	usoł	c										
Markerek	24	25	26	27	28	29	30	31	32	Gen 33	otíp 34	usoł 35	(36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Markerek Xwmc73	24 b	25 b	26 b	27 a	28 a	29 a	30 a	31 a	32 a	Gen 33 a	otípo 34 b	u soł 35 b	к 36 а	37 b	38 a	39 b	40 a	41 -	42 b	43 b	44 b	45 a	46 b
Markerek Xwmc73 Xgwm213	24 b b	25 b b	26 b b	27 a a	28 a a	29 a a	30 a a	31 a a	32 a a	Gen 33 a a	otíp 34 b b	u soł 35 b b	36 a a	37 b b	38 a a	39 b b	40 a a	41 - a	42 b b	43 b a	44 b a	45 a a	46 b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371	24 b b b	25 b b b	26 b b b	27 a a a	28 a a a	29 a a a	30 a a a	31 a a b	32 a a b	Gen 33 a a b	otíp 34 b b b	u soł 35 b b b	36 a a a	37 b b b	38 a a a	39 b b b	40 a a a	41 - a a	42 b b b	43 b a a	44 b a a	45 a a a	46 b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499	24 b b b b	25 b b b b	26 b b b b	27 a a a a	28 a a a a	29 a a a a	30 a a a a	31 a b a	32 a a b a	Geno 33 a a b b	otípi 34 b b b b	usoł 35 b b b b	36 a a a a	37 b b b b	38 a a a a	39 b b b b	40 a a a	41 - a a a	42 b b b b	43 b a a a	44 b a a	45 a a a	46 b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639	24 b b b a	25 b b b a	26 b b b b a	27 a a a a	28 a a a a	29 a a a a	30 a a a a	31 a b a a	32 a b a a	Gen 33 a b b b b	otíp 34 b b b b b	usoł 35 b b b b b	36 a a a a a	37 b b b b b	38 a a a a	39 b b b b b	40 a a a b	41 - a a a	42 b b b b b	43 b a a a	44 b a a a	45 a a a a	46 b b b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554	24 b b b a a	25 b b b a a	26 b b b a a	27 a a a a a a	28 a a a a a a	29 a a a a a a	30 a a a a a	31 a b a a a	32 a b a a a	Gen 33 a b b b b b	otíp 34 b b b b b b b	usoł 35 b b b b b b	36 a a a a a a a	37 b b b b b b	38 a a a a b	39 b b b b b b b	40 a a a b b	41 - a a a a a	42 b b b b b b b	43 b a a a a	44 b a a a a	45 a a a a a a	46 b b b b b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554 Xgwm408	24 b b b a a a	25 b b b a a b	26 b b b a a b	27 a a a a a a a	28 a a a a a a a	29 a a a a a a a	30 a a a a a a a	31 a b a a a a	32 a b a a a a	Gen 33 a b b b b b b b	otípi 34 b b b b b b b b	usol 35 b b b b b b b b	36 a a a a a a a a a a	37 b b b b b b a	38 a a a b b	39 b b b b b b b b	40 a a b b b	41 - a a a a b	42 b b b b b b b a	43 b a a a a a a	44 b a a a a a	45 a a a a a b	46 b b b b b b b a
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554 Xgwm408 Xgwm604	24 b b b a a a a	25 b b b b a a b b	26 b b b b a a b b	27 a a a a a a a a	28 a a a a a a a a	29 a a a a a a a a	30 a a a a a a a a a	31 a a b a a a a a	32 a a b a a a a a	Gen 33 a b b b b b b b b b	otípi 34 b b b b b b b b b	usol 35 b b b b b b b b b	36 a a a a a a a a a a	37 b b b b b a a	38 a a a a b b b	39 b b b b b b b b b	40 a a a a b b b a	41 - a a a a b b	42 b b b b b b b a a	43 b a a a a a a a	44 b a a a a a a a	45 a a a a a b b	46 b b b b b b b a a

									(Gen	otíp	usol	ĸ		
Markerek	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
Xwmc73	b	b	а	b	b	а	а	а	-	а	а	а	а	а	b
Xgwm213	b	b	b	а	b	а	а	а	-	а	а	а	а	а	b
Xgwm371	b	b	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm499	b	b	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm639	b	b	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm554	b	b	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b
Xgwm408	b	а	а	а	а	b	b	b	а	b	b	b	b	а	а
Xgwm604	а	а	а	а	а	а	а	а	а	-	а	а	а	а	а
Xwmc235	а	а	b	а	а	а	а	а	а	-	а	а	b	а	а

		Szűlők
Markerek	Chinese Spring	Chinese Spring(Cheyenne5B)
Xwmc73	а	b
Xgwm213	а	b
Xgwm371	а	b
Xgwm499	а	b
Xgwm639	а	b
Xgwm554	а	b
Xgwm408	а	b
Xgwm604	а	b
Xwmc235	а	b

II. Táblázat: A Hobbit x Hobbit(Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési populáción kapott markerezési adatok. Baloldalt láthatók az egyes SSR és RFLP markerek, a felső sorokban pedig az egyes vonalak. A Táblázat végén láthatók a szülői adatok.

									Gen	otíp	usol	k											
Markerek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Xwmc73	а	а	а	b	b	b	b	а	а	b	b	b	а	а	b	а	b	а	b	b	а	а	а
Xpsr128	а	а	-	b	b	b	b	а	а	b	-	b	а	а	b	а	b	а	b	b	а	а	а
Xgwm213	-	а	b	b	b	b	b	а	а	b	а	b	а	а	b	а	b	а	b	b	а	а	а
Xgwm371	b	а	b	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	а	а
Xgwm499	b	а	b	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	b	b
Xgwm639	b	а	-	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	b	b
Xgwm554	b	а	-	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	b	b
Xpsr637	b	а	b	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	b	b
Xpsr911	b	а	b	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	а	b	-	а	а	b	b	а	b	b
Xcdo504	а	а	-	b	b	а	b	а	b	b	а	b	b	а	b	b	а	b	а	b	b	b	b
Xgwm408	а	а	а	b	а	а	b	а	b	b	а	b	b	а	b	b	а	b	а	b	b	b	b
Xwmc75	а	а	а	b	а	а	b	а	b	b	b	b	b	а	b	b	а	b	а	b	b	b	b
Xcdo457	а	а	-	b	а	а	b	а	а	а	а	b	а	а	b	b	а	а	а	b	а	b	b
Xwmc235	а	а	а	b	b	b	b	а	b	а	а	b	а	а	b	b	а	а	а	b	b	b	b
									Gen	otíp	uso	k											
Markerek	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
Xwmc73	а	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	b	а	а	а
Xpsr128	-	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	-	b	а	а	а

Xwmc73	а	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	b	а	а	а
Xpsr128	-	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	-	b	а	а	а
Xgwm213	а	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	b	а	а	а
Xgwm371	а	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	а	а	а	а
Xgwm499	а	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	а	а	а	а
Xgwm639	-	а	b	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	-	а	а	а	b
Xgwm554	-	а	b	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	-	а	а	а	b
Xpsr637	а	а	b	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	а	а	а	b
Xpsr911	а	а	b	а	а	b	а	а	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	а	а	а	а	b
Xcdo504	-	а	b	-	а	b	а	b	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	-	а	а	а	b
Xgwm408	а	а	b	b	а	b	а	b	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	b	а	а	а	b
Xwmc75	а	а	b	b	а	b	а	b	а	а	а	а	а	b	b	b	b	а	b	а	а	а	b
Xcdo457	-	-	b	-	а	а	b	b	-	а	а	b	а	b	а	а	b	а	-	а	а	а	b
Xwmc235	b	а	b	а	а	а	b	b	b	а	а	а	а	b	b	а	а	b	b	а	а	а	b

II. Táblázat folytatás

								(Gen	otíp	usol	ĸ											
Markerek	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
Xwmc73	а	а	b	а	а	b	b	а	а	а	b	а	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b	а
Xpsr128	а	b	b	а	а	b	а	а	а	-	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xgwm213	а	b	b	а	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xgwm371	а	b	b	а	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xgwm499	а	b	b	b	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xgwm639	а	b	b	b	а	b	b	а	а	-	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xgwm554	а	b	b	b	а	b	b	а	а	-	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xpsr637	а	b	b	b	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xpsr911	а	b	b	b	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	b	b	а
Xcdo504	b	b	а	b	а	b	b	а	а	-	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	b	а
Xgwm408	b	b	а	b	а	b	b	а	а	b	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	b	а
Xwmc75	b	b	а	b	а	b	b	а	а	b	а	а	а	а	b	а	а	а	а	а	а	b	а
Xcdo457	b	b	а	b	а	b	b	а	а	-	b	а	а	b	b	а	а	а	а	b	b	b	а
Xwmc235	b	b	а	b	а	b	b	а	b	b	а	а	а	b	b	а	а	а	b	b	b	b	а

			Gen	otíp	usol	ĸ			Szülők
Markerek	70	71	72	73	74	75	76	Hobbit	Hobbit(Chinese Spring 5BL)
Xwmc73	b	а	а	а	а	а	а	а	b
Xpsr128	b	-	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm213	b	b	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm371	b	b	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm499	b	b	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm639	b	-	а	b	а	а	а	а	b
Xgwm554	b	-	а	b	а	а	а	а	b
Xpsr637	b	b	а	b	а	а	а	а	b
Xpsr911	b	b	а	b	а	а	а	а	b
Xcdo504	b	-	b	b	b	а	а	а	b
Xgwm408	b	b	b	b	b	а	а	а	b
Xwmc75	b	b	b	b	b	а	а	а	b
Xcdo457	b	-	b	b	b	а	а	а	b
Xwmc235	b	b	b	b	b	а	а	а	b

III. Táblázat: A Chinese Spring x Chinese Spring (Cheyenne 5B) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési populáción kapott markerezési adatok. Baloldalt láthatók az egyes SSR markerek, a felső sorban pedig az egyes vonalak. Az adatok megegyeznek a virágzási időt befolyásoló lókuszok térképezésénél használtakkal, annyi különbséggel, hogy itt hiányoznak a 11-es, 18-as, 54-es, 61-es vonalak. Legalul láthatók a szülői adatok.

										Gen	otíp	usol	k										
Markerek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	19	20	21	22	23	24	25
Xwmc73	b	b	b	а	а	b	а	а	b	b	b	а	а	а	b	b	b	а	а	а	а	b	b
Xgwm213	b	b	b	а	а	b	b	b	b	b	b	а	а	а	b	b	b	а	а	а	а	b	b
Xgwm371	b	b	b	а	а	b	b	b	а	b	b	b	b	b	b	b	b	а	а	а	а	b	b
Xgwm499	b	b	b	b	b	b	b	b	а	b	b	b	b	b	b	b	b	а	а	а	а	b	b
Xgwm639	b	b	а	b	b	b	b	b	а	b	b	а	а	а	b	b	b	а	b	b	а	а	а
Xgwm554	b	b	а	b	b	b	b	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	а	b	b	а	а	а
Xgwm408	b	b	а	а	а	b	b	b	а	а	b	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm604	b	b	а	а	а	b	b	b	а	а	а	b	b	b	b	b	а	а	b	b	а	а	b
Xwmc235	b	b	а	а	а	а	b	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b	b	а	а	b
										Gen	otíp	usol	k										
Markerek	26	27	28	29	30	31	32	33	34	Gen 35	otípi 36	usol 37	k 38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Markerek Xwmc73	26 b	27 a	28 a	29 a	30 a	31 a	32 a	33 a	34 b	Gen 35 b	otípi 36 a	usol 37 b	k 38 a	39 b	40 a	41 -	42 b	43 b	44 b	45 a	46 b	47 b	48 b
Markerek Xwmc73 Xgwm213	26 b b	27 a a	28 a a	29 a a	30 a a	31 a a	32 a a	33 a a	34 b b	Gen 35 b b	otípi 36 a a	usol 37 b b	k 38 a a	39 b b	40 a a	41 - a	42 b b	43 b a	44 b a	45 a a	46 b b	47 b b	48 b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371	26 b b b	27 a a a	28 a a a	29 a a a	30 a a a	31 a a b	32 a a b	33 a a b	34 b b b	Gen 35 b b b	otípi 36 a a a	u sol 37 b b b	k 38 a a a	39 b b b	40 a a a	41 - a a	42 b b b	43 b a a	44 b a a	45 a a a	46 b b b	47 b b b	48 b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499	26 b b b	27 a a a a	28 a a a a	29 a a a	30 a a a a	31 a b a	32 a b a	33 a a b b	34 b b b b	Gen 35 b b b b	otípi 36 a a a a	usol 37 b b b b	k 38 a a a a	39 b b b b	40 a a a	41 - a a	42 b b b	43 b a a a	44 b a a a	45 a a a a	46 b b b	47 b b b	48 b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639	26 b b b a	27 a a a a	28 a a a a	29 a a a a	30 a a a a	31 a b a a	32 a b a a	33 a b b b	34 b b b b b	Gen 35 b b b b b b	otípi 36 a a a a a	usol 37 b b b b b	k 38 a a a a a	39 b b b b b	40 a a a b	41 - a a a a	42 b b b b b	43 b a a a	44 b a a a	45 a a a a	46 b b b b	47 b b b b b	48 b b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554	26 b b b a a	27 a a a a a	28 a a a a a	29 a a a a a a	30 a a a a a a	31 a b a a a	32 a b a a a	33 a b b b b	34 b b b b b b	Gen 35 b b b b b b	a a a a a a a a a	usol 37 b b b b b b	k 38 a a a a b	39 b b b b b	40 a a a b b	41 - a a a a a	42 b b b b b b	43 b a a a a	44 b a a a a	45 a a a a a a	46 b b b b b	47 b b b b b	48 b b b b b
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554 Xgwm408	26 b b b a a b	27 a a a a a a a	28 a a a a a a a	29 a a a a a a a	30 a a a a a a a	31 a b a a a a	32 a b a a a a	33 a b b b b b	34 b b b b b b b b b	Gen 35 b b b b b b b b	otípi 36 a a a a a a a a	usol 37 b b b b b b a	8 38 a a a a a b b	39 b b b b b b b	40 a a a b b b	41 - a a a a b	42 b b b b b b a	43 b a a a a a a	44 b a a a a a a	45 a a a a a b	46 b b b b b a	47 b b b b b b b	48 b b b b b a
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554 Xgwm408 Xgwm604	26 b b b a a b b	27 a a a a a a a a	28 a a a a a a a a	29 a a a a a a a a	30 a a a a a a a a	31 a b a a a a a	32 a b a a a a a	33 a b b b b b b b	34 b b b b b b b b b b b	Gen 35 b b b b b b b b b b	otípi 36 a a a a a a a a	usol 37 b b b b b a a	k 38 a a a a b b b	39 b b b b b b b b b	40 a a a a b b b a	41 - a a a a b b	42 b b b b b a a	43 b a a a a a a a	44 b a a a a a a	45 a a a a b b	46 b b b b b a a	47 b b b b b b a	48 b b b b b a a
Markerek Xwmc73 Xgwm213 Xgwm371 Xgwm499 Xgwm639 Xgwm554 Xgwm408 Xgwm604 Xwmc235	26 b b b b a a b b b b	27 a a a a a a a a a a	28 a a a a a a a a a	29 a a a a a a a a	30 a a a a a a a a a	31 a b a a a a a a	32 a b a a a a a a	33 a b b b b b b b b	34 b b b b b b b b b b	Gen 35 b b b b b b b b b b b b	otípi 36 a a a a a a a a a	usol 37 b b b b b a a a	k 38 a a a b b b b b	39 b b b b b b b b	40 a a a b b a a	41 - a a a a b b b	42 b b b b b a a	43 b a a a a a a a	44 b a a a a a a a	45 a a a a b b b	46 b b b b b b a a	47 b b b b b b a a	48 b b b b a a a

			(Gen	otíp	usol	k						Szülők
Markerek	49	50	51	52	53	55	56	57	58	59	60	Chinese Spring	ChineseSpring(Cheyenne5B)
Xwmc73	а	b	b	а	а	-	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm213	b	а	b	а	а	-	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm371	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm499	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm639	b	а	b	а	а	а	а	а	а	а	а	а	b
Xgwm554	b	а	b	а	а	а	а	а	а	b	b	а	b
Xgwm408	а	а	а	b	b	а	b	b	b	b	а	а	b
Xgwm604	а	а	а	а	а	а	-	а	а	а	а	а	b
Xwmc235	b	а	а	а	а	а	-	а	а	b	а	а	b

IV. Táblázat: A Chinese Spring x Chinese Spring(Cheyenne 5B) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló, nem vernalizált térképezési populáció vonalainak virágzási ideje napokban. Legalul láthatók a szülői értékek.

	Vernalizálatlan növények		Vernalizálatlan növények
Genotípusok	virágzási ideje (nap)	Genotípusok	virágzási ideje (nap)
1	78,10	32	69,00
2	73,70	33	67,40
3	80,80	34	80,00
4	74,80	35	72,30
5	77,30	36	70,90
6	72,60	37	67,80
7	71,10	38	66,40
8	70,00	39	70,20
9	74,30	40	68,20
10	77,10	41	68,20
11	72,60	42	75,00
12	71,30	43	88,40
13	70,70	44	82,10
14	66,60	45	75,40
15	71,10	46	73,60
16	72,00	47	83,60
17	81,00	48	72,70
18	76,60	49	79,40
19	74,50	50	81,80
20	71,60	51	78,90
21	68,10	52	80,20
22	72,00	53	80,90
23	70,80	54	83,20
24	72,50	55	80,20
25	71,50	56	76,10
26	72,80	57	77,80
27	68,90	58	86,10
28	68,70	59	76,90
29	70,60	60	79,20
30	70,10	61	78,50
31	66,90		

	Vernalizálatlan növények
Szülők	virágzási ideje (nap)
Chinese Spring	70,6
Chinese Spring(Cheyenne5B)	75,6

V. Táblázat: A Hobbit x Hobbit(Chinese Spring 5BL) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési populáció, 6 hétig vernalizált vonalainak virágzási ideje napokban. Legalul láthatók a szülői értékek.

	6 hétig vernalizált növények	ζ.	6 hétig vernalizált növények
Genotípuso	k virágzási ideje (nap)	Genotípusok	virágzási ideje (nap)
1	82,60	39	97,60
2	94,60	40	91,30
3	87,60	41	89,80
4	89,80	42	85,80
5	97,00	43	77,60
6	92,60	44	94,40
7	95,30	45	89,00
8	91,00	46	82,80
9	88,80	47	86,80
10	89,60	48	99,50
11	85,80	49	82,00
12	86,00	50	94,00
13	95,60	51	90,40
14	84,40	52	85,20
15	90,00	53	98,60
16	87,60	54	89,40
17	99,80	55	87,00
18	85,40	56	102,70
19	94,30	57	84,80
20	86,40	58	83,60
21	85,20	59	89,40
22	96,00	60	88,80
23	93,30	61	88,60
24	82,00	62	88,00
25	83,40	63	92,00
26	85,20	64	88,20
27	91,20	65	88,60
28	86,40	66	88,00
29	95,30	67	98,30
30	90,80	68	87,50
31	87,80	69	88,80
32	89,60	70	89,20
33	89,20	71	90,00
34	85,60	72	84,80
35	100,00	73	88,80
36	94,80	74	82,60
37	87,50	75	87,00
38	85,40	76	86,40
		6 hétig vernalizált r	növények
	Szülők	virágzási ideje	(nap)
	Hobbit	88,5	
	Hobbit(Chinese Spring 5BL)	86	

VI. Táblázat: A Chinese Spring x Chinese Spring(Cheyenne 5B) keresztezésből származó, egy kromoszómára rekombináns vonalakból álló térképezési populáció vonalainak –11°C-os, és –12°C- os fagyasztást követő bonitálási értékei (0:teljes elfagyás; 5:sérülésmentes túlélés). Legalul láthatók a szülői értékek.

Fagyasztási hőmérséklet			Fagyasztási hőmérséklet		
Genotípusok	-11°C	-12°C	Genotípusok	-11°C	-12°C
1	1,70	2,00	32	2,10	0,80
2	3,40	2,20	33	2,40	1,50
3	2,30	2,00	34	2,40	1,50
4	2,40	2,10	35	2,60	1,70
5	2,10	2,20	36	2,50	0,60
6	2,70	1,80	37	1,60	1,20
7	2,80	2,50	38	2,20	0,70
8	1,90	2,30	39	2,30	1,40
9	1,30	0,60	40	2,50	1,90
10	2,10	1,80	41	1,90	0,60
12	1,40	1,90	42	1,50	1,50
13	1,40	0,60	43	1,70	0,10
14	1,80	1,10	44	1,80	0,50
15	0,90	0,90	45	1,90	0,60
16	2,60	2,10	46	2,70	1,40
17	2,50	2,40	47	2,40	1,40
19	3,00	2,00	48	2,40	1,30
20	1,80	0,90	49	3,10	1,30
21	2,30	3,00	50	2,00	0,70
22	2,50	2,70	51	2,20	1,20
23	1,40	0,40	52	1,40	0,40
24	3,00	1,90	53	1,30	0,70
25	2,00	0,60	55	2,00	0,50
26	1,80	0,80	56	1,80	0,50
27	2,20	0,80	57	1,80	0,20
28	1,50	1,20	58	0,90	0,30
29	1,60	0,90	59	1,60	0,70
30	1,50	1,30	60	1,50	0,30
31	1.30	0.70			

	Fagyasztási hőmérséklet		
Szülők	-11°C	-12°C	
Chinese Spring	1,8	0,5	
ChineseSpring(Cheyenne5B)	2,8	2,0	

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézete Vezetőségének, hogy lehetővé tette munkám elvégzését intézetünkben.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Galiba Gábornak a szakmai segítségéért, tanácsaiért, irányításáért.

Köszönöm Dr. Sutka József hasznos tanácsait, a tesztelések során nyújtott segítségét, és a rendelkezésemre bocsátott genetikai alapanyagokat, és köszönöm a MTA MGKI Genetikai Osztályán dolgozó munkatársaim támogatását, tanácsait, biztatását.

Hálás vagyok Dr. John W. Snape-nek (Department of Crop Genetics, John Innes Centre, Norwich, UK) kiváló szakmai irányításáért és a lehetőségért, hogy 6 hónapot a csoportjában dolgozhattam a Marie Curie Training Site Fellowship (HPMT-CT-2000-00033) támogatásával.

Köszönöm az olasz kollégáknak, Dr. Nicola Pecchioninak és Enrico Francianak (Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Fiorenzuola d'Arda) baráti együttműködését és segítségét.

Köszönöm a Biorex RT és az ott dolgozó kollégáim anyagi és szakmai támogatását.

Köszönöm a Szent István Egyetem Genetika és Növénynemesítés Tanszék munkatársainak a doktori képzésben nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm családom, szüleim, testvérem támogatását, türelmét és megértését, mellyel a nyugodt hátteret biztosították, ami nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Dolgozatomat nemrég elhunyt édesapám emlékének ajánlom.

84