

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**PCR alapú molekuláris markerek azonosítása és  
felhasználása a búza levélrozsdá rezisztenciára való  
nemesítésben**

**Doktori (PhD) értekezés**

**Tremmelné Tar Melinda**

**Gödöllő**

**2012.**

**Doktori iskola:** Növénytudományi Doktori Iskola

**Tudományága:** Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

**Vezetője:** Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja  
egyetemi tanár,  
SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet

**Témavezető:** Dr. Purnhauser László  
tudományos főmunkatárs,  
mezőgazdasági tudományok kandidátusa  
Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged

.....  
Dr. Heszky László  
iskolavezető

.....  
Dr. Purnhauser László  
témavezető

# TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK .....	3
1. BEVEZETÉS .....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	9
2.1 A búza levéltrozsa tünetei és kártétele .....	9
2.2 <i>Lr</i> gének búzában.....	11
2.3 A búza levéltrozsa rezisztencia génekkel kapcsolatban öröklődő markerek azonosítása - térképezési populációk.....	16
2.4 A búza levéltrozsa rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerek típusai.....	18
2.5 A levéltrozsa rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerek alkalmazása a nemesítésben .....	23
3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....	27
3.1 Molekuláris markerek azonosítására használt növényanyag .....	27
3.2 Az F <sub>2</sub> populációk növényeinek inokulációja és fenotípusos vizsgálata .....	27
3.3 DNS izolálás.....	30
3.3.1 Az izolált DNS mennyiségének becslése.....	31
3.4 RAPD analízis.....	31
3.5 AFLP analízis.....	31
3.5.1 Genomiális DNS minták emésztése és az adapterek ligálása .....	32
3.5.2 Preamplifikáció .....	32
3.5.3 Főamplifikáció .....	32
3.6 RGAP analízis.....	33
3.7 STS analízis.....	33
3.8 SSR analízis.....	33
3.9 Statisztikai számítások .....	34
3.9.1 Chi <sup>2</sup> analízis .....	34
3.9.2 Genetikai térképezés .....	34
3.9.3 Student-próba .....	35
3.10 Markerre alapozott szelekció tesztelése.....	35
3.11 Az <i>Lr20</i> , <i>Lr52</i> és <i>Lr34</i> gének azonosítása őszi búzafajtákban .....	35
4. EREDMÉNYEK .....	37
4.1 Az <i>Lr20</i> génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása és jellemzése .....	37
4.1.1 Fenotipizálás .....	37
4.1.2 <i>Xsts638</i> marker jellemzése a NIL <i>Lr20</i> /GK Délibáb F <sub>2</sub> populációban .....	38
4.1.3 Az <i>Lr20</i> génhez kapcsolt AFLP markerek azonosítása .....	39

4.1.4	Az <i>Lr20</i> génhez kapcsolt RGAP markerek azonosítása .....	41
4.1.5	Az <i>Lr20</i> génhez kapcsolt SSR markerek azonosítása és jellemzése .....	42
4.2	Az <i>Lr52</i> génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása és jellemzése .....	45
4.2.1	Fenotipizálás .....	45
4.2.2	Az <i>Lr52</i> génhez kapcsolt RAPD marker azonosítása .....	48
4.2.3	Az <i>Lr52</i> génhez kapcsolt STS marker azonosítása .....	49
4.2.4	Az <i>Lr52</i> génhez kapcsolt SSR markerek azonosítása .....	50
4.3	Molekuláris markerek gyakorlati alkalmazása .....	55
4.3.1	Markerre alapozott szelekció .....	55
4.3.2	<i>Lr</i> gének azonosítása búzafajtákban molekuláris markerek segítségével .....	56
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	71
5.1	Az <i>Lr20</i> gén molekuláris markerezési eredményeinek értékelése, következtetések .....	71
5.2	Az <i>Lr52</i> gén molekuláris markerezésének értékelése, következtetések .....	73
5.3	Markerre alapozott szelekció és <i>Lr</i> gének azonosítása molekuláris markerek segítségével búzafajtákban .....	74
5.4	Új tudományos eredmények .....	78
6.	ÖSSZEFOGLALÁS .....	79
7.	SUMMARY .....	83
8.	MELLÉKLETEK .....	87
8.1	Irodalomjegyzék .....	87
8.2	A kísérletekben használt RAPD primerek jegyzéke és szekvenciája .....	104
8.3	AFLP vizsgálathoz használt PstI és MseI adapterek, preszelektív és szelektív primerek szekvenciája .....	107
8.4	RGAP vizsgálathoz használt primerek neve és szekvenciája .....	108
8.5	A búza 7A kromoszómájának hosszú karjára specifikus SSR primerek .....	109
8.6	A búza 5B kromoszómájának rövid karjára specifikus SSR primerek .....	111
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	113

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP	amplified fragment length polymorphism (amplifikált fragmenthossz polimorfizmus)
BC	back cross (visszakeresztetés)
bp	bázispár
BSA	bulk segregant analysis (csoportos hasadáselemzés)
cM	centi Morgan
CTAB	cetil-trimetil-ammónium-bromid
DH	doubled haploid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GK	Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged
ISSR	inter simple sequence repeat (egyszerű belső szekvencia ismétlés)
IT	infekciós típus
Lr	levélrozsda rezisztenciagén
LRR	leucin repeat (leucinban gazdag ismétlődés)
MAS	marker assisted selection (markerre alapozott szelekció, vagy marker támogatta szelekció)
Mv	MTA Agrártudományi Központ Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár
NBS	nucleotid binding site (nukleotid kötődési hely)
NIL	near isogenic line (közel izogén vonal)
P	valószínűség
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
QTL	quantitative trait loci (mennyiségi jelleget meghatározó lokuszok)
R	rezisztens
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA (véletlenszerűen amplifikált polimorf DNS)
df	szabadságfok
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)
RGAP	resistance gene analog polymorphism (rezisztenciagén analóg polimorfizmus)
RIL	recombinant inbred lines (rekombináns beltenyésztett vonalak)

rpm	rotation per minute (fordulatszám/perc)
S	susceptible (fogékony)
SCAR	sequence characterized amplified region (feltárt szekvenciájú amplifikált régió)
SSD	single seed descent (egymag szelekciós módszer)
SSR	simple sequence repeat (egyszerű szekvencia ismétlődés)
STS	sequence tagged site (szekvenciával jelölt hely)
U	unit (egység)

# 1. BEVEZETÉS

Magyarországon a búza egyik legveszélyesebb betegsége a levélrozsda. A kórokozó számára kedvező években a levélrozsda komoly, akár 50%-os termésvesztést is okozhat a fogékony fajtákban. Bár a betegség elleni védekezés többnyire megoldható fungicidek használatával, mégis a leghatékonyabb, egyben legolcsóbb eljárás a rezisztens fajták termesztése, melyek további előnye, hogy használatuk semmiféle környezeti károsodást, vagy élelmezés-egészségügyi gondot nem okoz.

A rezisztens fajták előállítására komoly kihívás a növénynevelés felé. A nemesítést nagyon megnehezíti, hogy a betegséget kiváltó kórokozók variábilisak, így valamely búzafajta, amelyik rezisztens az egyik kórokozó rasszal szemben, fogékony lehet a másikkra. A kórokozók változékonyságát jellemzi, hogy ma csupán a búza levélrozsda több száz rassz ismeretes. A rezisztens fajták előállításához ezért folyamatos nemesítési munka (rezisztenciaforrások felkutatása és a rezisztenciáknak beépítése) szükséges.

Napjainkban mintegy hatvan búza *Lr* gén ismert. Túlnyomó részük rasszspecifikus rezisztenciáknak, ami általában csíranövénykorban is megnyilvánul (pl. *Lr20* és *Lr52*). Közülük mára csak kevés nyújt önmagában megfelelő védelmet a levélrozsda ellen, mivel a kórokozó változékonyságának következtében időről időre új virulens rasszok jelentek meg. Vannak azonban nem rasszspecifikus rezisztenciáknak is, amelyek csak felnőttkorban nyilvánulnak meg (pl. *Lr34*). Bár ezek általában csak részleges védelmet nyújtanak, de hatásuk idővel nem romlik le (tartós rezisztencia). A tartós, ugyanakkor erős rezisztencia létrehozásához a búzafajtába általában nem egy, hanem több rezisztenciáknak (pl. egy nem rasszspecifikus és egy vagy több rasszspecifikus) együttes bevitelére (génhalmozás, más néven gén piramidálás) nyújthat kielégítő eredményt. Köztudott, hogy a nagyszámú ismert *Lr* génhez képest a köztermesztésben lévő fajtákban mindössze néhány hatékony *Lr* gén fordul elő, ezért a genetikai diverzitás növelése érdekében érdemes új, hazánkban eddig nem használt *Lr* géneket is bevonni a nemesítésbe (pl.: *Lr20* és *Lr52*).

Egy vagy több rezisztenciáknak egy búzafajtába való beépítésének hagyományos módja idő és munkaigényes folyamat, mivel minden szelekciós lépésben elengedhetetlen a rezisztencia tesztelése mesterséges inokulálással. Ehhez elkerülhetetlen a különböző levélrozsda rasszok fenntartása fenntartása és a nemesítési törzsek ezekkel való üvegházi vagy szántóföldi inokulációja. A rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek segítségével azonban mára viszonylag egyszerűvé vált az egyes rezisztenciáknak egymástól

független beépítése és nyomon követése az adott búza elit genotípusokba (MAS). A köztermesztésben lévő őszi búzafajták levélrozda ellenállóságáról a nemesítőknek általában a megfigyeléseiken alapuló információik vannak anélkül, hogy tudnák, mely rezisztencia gén(ek) okozzák azt. Napjainkban a nemesítők egyre tudatosabb és tervezhetőbb nemesítés érdekében fontosabbnak tartják, hogy az adott fajta vagy törzs fenotípusa mellett ismerjék annak genetikai hátterét is. A molekuláris markerek alkalmazásának ezért a másik fő területe az ismeretlen genetikai hátterű fajták rezisztenciagénjeinek azonosítása. A gyakorlati alkalmazás szempontjából fontos, hogy a molekuláris marker az adott rezisztencia génnel szoros kapcsoltságban öröklődjön, a heterozigóta és homozigóta egyedek elkülönítése végett kodomináns legyen, valamint megbízhatóan és rutinszerűen alkalmazható legyen — ilyenek például az SSR markerek. Bár számos *Lr* génhez kapcsolt molekuláris markert ismerünk, nagy részük azonban nem kodomináns öröklődésű illetve a rezisztenciagénnel nem elég szorosan kapcsolt; mindezért továbbra is szükség van újabb, az *Lr* génekhez minél szorosabb kapcsoltságban öröklődő markerek azonosítására.

A dolgozat két kutatási téma eredményeit foglalja össze. Az első rész közepesen hatékony *Lr* génekkel (*Lr20* és *Lr52*) kapcsoltan öröklődő molekuláris markerek azonosítását és genetikai térképezését mutatja be. A második részben az említett *Lr* génekhez valamint az *Lr34* génhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek diagnosztikus és nemesítési célú gyakorlati alkalmazásának eredményeit foglalja össze.

Az egyes témák célkitűzései a következők voltak:

1. Az *Lr52* és *Lr20* levélrozda rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt domináns és kodomináns öröklődésű molekuláris markerek azonosítása, jellemzése és genetikai térképezése.
2. Az *Lr20* génnel szorosan kapcsolt STS markerének alkalmazása egy markerre alapozott szelekciós programban.
3. Az *Lr52*, *Lr20* és *Lr34* gének azonosítása, és gyakoriságuk vizsgálata a Magyarországon 1970 és 2005 között elismert őszi búza fajtákban molekuláris markerek felhasználásával, valamint az *Lr34* gén hatékonyságának elemzése több éves megfigyelésen alapuló természetes szántóföldi levélrozda fertőzöttségi adatok segítségével.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A búza levélrozsa tünete és kártétele

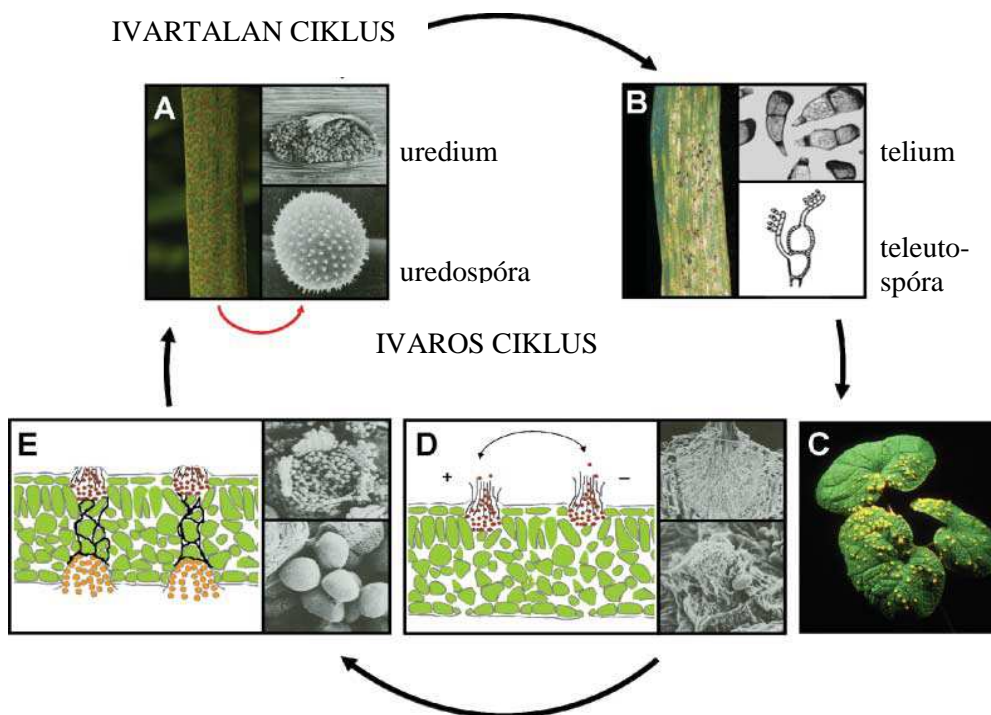
Az őszi búza (*Triticum aestivum* L.) betegségei közül a levél- vagy vörösrozsa (*Puccinia recondita* Rob. ex Desmaz. f. sp. *tritici* /Eriks./, syn.: *Puccinia triticina* Eriks.) (1. ábra) világszerte elterjedt. A fajták fogékonyságától valamint a környezeti tényezőktől függően akár 40-80 %-os (Barabás és Matuz 1983, McIntosh és mtsai 1995, Kolmer 1996, Bolton és mtsai 2008) termésvesztést is okozhat. A betegség a legnagyobb veszteséget akkor okozza, ha már a virágzáskor vagy közvetlen utána jelentős, 30-50 %-os levélborítottság látható. Ezesetben akár 80 %-os termésvesztés is előfordulhat. A kései betegségmegjelenés okozta veszteségek azonban mérsékeltek, vagy akár el is maradhatnak. A termésvesztés a gombafertőzés következtében kialakult asszimilációs felület csökkenésének következménye, amely alacsonyabb ezerszemtömeget és kevesebb kalásonkénti szemszámot eredményez (Bolton és mtsai 2008).

Az 1950-es évektől kezdődően fokozatosan nőtt a levélrozsa jelentősége, és napjainkra hazánkban a kórokozó megjelenésére minden évben lehet számítani. (Szunics és mtsai 2001, Csősz és mtsai 2008, Manninger 2008). Súlyos járványait a következő években tapasztalták: 1952, 1957, 1958, 1975, 1981, 1982, 1988, 1990, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998 (Szunics és mtsai 2001), 1999 (Csősz és mtsai 2000), 2006 (Csősz és mtsai 2008).



1. ábra. A levélrozsa uredospóráinak megjelenése a fogékony búzafajtán

A levélrozsa biotróf kórokozó, ezért csak az élő levélszöveten képes életben maradni. Legfontosabb gazdanövénye a közönséges hexaploid búza, de előfordulhat durum búzán (*Triticum turgidum* ssp. *durum*), *Triticum dicoccoides* Körn., *Triticum dicoccum* és *Aegilops* fajokon is (Bolton és mtsai 2008). Levélrozsa járvány kialakulására 15-25 °C közötti párás meleg és a betegségre fogékony búzafajták termesztése esetén lehet számítani. Az enyhe őszi és tél után az őszi vetéseken áttelelő gomba már március végén, április elején szórványos telepeket képez, és virágzáskor már jelentős fertőződést tud előidézni. A legtöbb évben azonban május közepe előtt ritkán jelenik meg (Csósz 2007). A világosbarna uredotelepek kör alakúak, 1-2 mm átmérőjűek és elsősorban a levél színén, de elvétve a levél fonákán is megtalálhatóak. A búza érésekor a levél fel nem repedt epidermisze alatt kialakulnak a fekete színű teleuto telepek, a kórokozó szaporodása leáll. A levélrozsa köztesgazdái a *Thalictrum*, *Isopyrum*, *Anchusa* és *Clematis* fajok, melyeken a gomba ivaros szaporodási ciklusa megy végbe elősegítve a genetikai rekombinálódást és így az új rasszok kialakulását (Roelfs és mtsai 1992, Bolton és mtsai 2008) (2. ábra).



**2. ábra.** A búza levélrozsa fejlődésmenete (forrás: Bolton és mtsai 2008)

## 2.2 Lr gének búzában

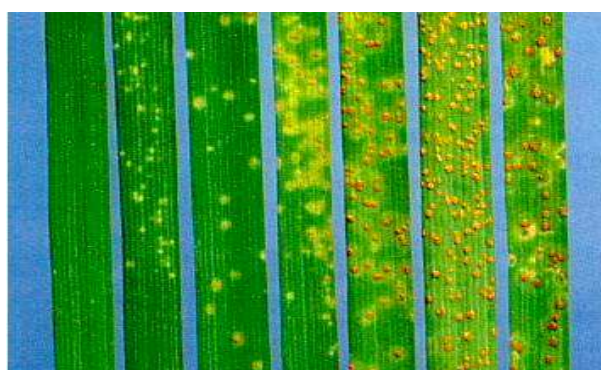
Napjainkig mintegy hatvan búza Lr gént írtak le, amelyek jelentős részét térképezték is a búza kromoszómákon (McIntosh és mtsai 2003, 2009 és 2011). Az Lr gének nagy hányada nem *T. aestivum* eredetű, ezeket a búzával közeli rokonságban álló fajokból és nemzetségekből építették be (1. táblázat) az őszi búzába. Egyes Lr gének esetében előfordul, hogy más rezisztenciagénekkel vagy morfológiai jelleggel együtt öröklődik. Az Lr20 génről például megállapították, hogy teljes kapcsoltságban öröklődik a *Pm1* lisztharmat, valamint az *Sr15* szárrozsa rezisztencia génekkel (Watson és Luig 1966, Sears és Briggie 1969, McIntosh 1977). Az Lr34 génről leírták, hogy nemcsak az *Yr18* sárgarozsa (McIntosh 1992; Singh 1992a), a *Pm38* lisztharmat (Spielmeyer és mtsai 2005) rezisztencia génekkel, hanem a levélcsúcs száradás morfológiai bélyeggel (Singh 1992b) is teljes kapcsoltságban öröklődik (*Ltn1* gén), valamint ez a lókuszt árpa sárga törpülés vírus elleni toleranciát (*Bdv1*) is okoz (Singh 1993).

### 1. táblázat. A búza Lr génjeinek eredete

Faj	Lr gének
<b>Diploidok (2n=14)</b>	
<i>Aegilops tauschii</i> (Coss) Schal. / <i>Aegilops squarrosa</i> L.	Lr21, Lr22a, Lr32, Lr39, Lr41, Lr42 és Lr43
<i>Aegilops umbellulata</i> (Zhuk.)	Lr9
<i>Secale cereale</i> L.	Lr25, Lr26 és Lr45
<i>Aegilops speltoides</i> Tausch / <i>T. speltoides</i> (Tausch) Gren ex Richter	Lr28, Lr35, Lr36, Lr44, Lr47 és Lr51
<i>Aegilops sharonensis</i> Eig.	Lr56
<b>Tetraploidok (2n=28)</b>	
<i>Aegilops ventricosa</i> Tausch / <i>Triticum ventricosum</i> Ces	Lr37
<i>Triticum timopheevii</i> (Zhuk.)	Lr18 és Lr50
<i>Triticum turgidum</i> L. / <i>Triticum dicoccoides</i> Körn.	Lr23 és Lr53
<i>Aegilops geniculata</i> Roth	Lr57
<i>Aegilops triuncialis</i> L.	Lr58
<i>Aegilops peregrina</i> (Hack) Mare & Weiller	Lr59
<b>Hexaploidok (2n=42)</b>	
<i>Triticum aestivum</i> L.	Lr1, Lr2, Lr3, Lr10, Lr11, Lr12, Lr13, Lr14, Lr16, Lr17, Lr20, Lr22b, Lr27, Lr30, Lr31, Lr33, Lr34, Lr46, Lr48, Lr49, Lr52 és Lr60
<i>Agropyrum intermedium</i> (Host) P. Beauv.	Lr38
<b>Dekaploidok (2n=70)</b>	
<i>Agropyron elongatum</i> (host) Beauv.	Lr19, Lr24 és Lr29

Forrás: McIntosh és mtsai 2003, 2009 és 2011

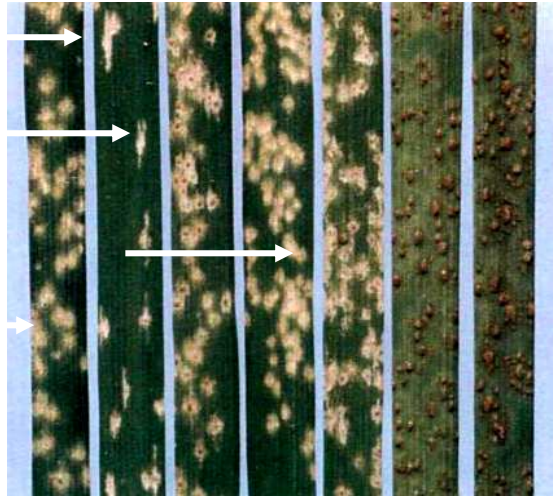
A *Lr* gének többsége a kórokozó fertőzésére rasszspecifikus rezisztenciát mutat, azaz azonos környezeti viszonyok között a levélrozsdá kisebb-nagyobb számú rassza ellen hatásos, míg másokkal szemben nem. A rasszspecifikus rezisztencia magyarázata a „gene for gene” (gén-génnel szemben) elmélet. Ez alapján: ha egy kórokozó rendelkezik domináns avirulencia génnel, amellyel szemben a gazdanövényben jelen van egy domináns rezisztencia gén, akkor a kórokozó és a gazdanövény kapcsolata rezisztens lesz. Az ok az, hogy a domináns avirulenciagén termel egy specifikus elicítort, amelyet a komplementer rezisztenciagénnel rendelkező gazdanövény felismer. Ilyenkor a gazdanövény a patogén fertőzésére sejtelhalással járó hiperszenzitív reakcióval felel, ami meggátolja a kórokozó felszaporodását és elterjedését a növényi szövetekben (Flor 1942, 1956 és 1971). Az előbbiekkal ellentétben, ha egy kórokozó rendelkezik ugyan domináns avirulencia génnel, de a gazdanövényben nincs jelen a komplementer domináns rezisztencia gén, akkor a termelt elicitor jelenléte nem vált ki reakciót a növényből (nincs receptora hozzá) vagy a kórokozó virulens az adott rezisztencia génre (nem termel elicítort), akkor a kórokozó és a gazdanövény kapcsolata fogékony típusú lesz. A gén-génnel szembeni kapcsolat megnyilvánulása a gazdanövényben az adott rezisztencia génre jellemző infekciós típus. A búzában a csíranövénykori infekciós típusokat 0-4 skálán fejezik ki (Stakman és mtsai 1962), ahol a 0 jelzi az immunis, azaz tünetmentes típust, a 4 jelzi a hiperszenzitív klorotikus foltok nélküli nagy, sporuláló uredotelepekkel rendelkező fogékony típust (3. ábra). Bizonyos *Lr* gének a kórokozó fertőzésére jellegzetes, csak az adott rezisztencia génre jellemző hiperszenzitív reakcióval felelnek (pl. *Lr20* rezisztencia gén). Az *Lr20* gént hordozó búzafajtáknál megfigyelték, hogy a fertőzés következtében jellegzetes hosszanti nekrotikus foltok alakulnak ki (4. ábra).



0 ; 1 2 3, 3<sup>+</sup> 4 X

(Forrás: McIntosh 1995)

**3. ábra.** Stakman és mtsai (1962) által kidolgozott értékelési skála a levélrozsdá infekciós típusainak meghatározásához



**4. ábra.** Az *Lr20* rezisztencia gén infekciós típusai csíranövény korban (forrás: McIntosh és mtsai 1995). A fehér nyilak a rezisztencia génre jellemző hosszanti nekrotikus foltokat jelzik.

A rasszspecifikus rezisztencia általában nem tekinthető tartósnak (Bennett 1984, Roberts és Caldwell 1970), mert néhány év alatt a rezisztens fajta fogékonyvá válhat egy addig nem ismert új rassz megjelenésével. Az új patotípusok megjelenése általában mutáció következménye vagy a korábban termesztett fajtákat nem fertőző, ezért az adott területen gyéren előforduló rasszok felszaporodása az új fajtákon. Jó példa erre az *Lr26* rezisztencia gént hordozó, kezdetben levélrozsdá rezisztens Avrora és Kavkaz, búzafajták rezisztenciájának megszűnése, e búzafajták hazai köztermesztésben való elterjedése során 1970-es évek elején (Manninger 1996, 2008).

Léteznek olyan *Lr* gének, mint pl. az *Lr34* és *Lr46*, amelyek a kórokozó populációban jelen lévő rasszok ellen nem biztosítanak ugyan teljes védelmet, de lassítják annak szaporodását és elterjedését a gazdanövényen. Fontos ismervük, hogy különböző rasszokkal vizsgálva mindegyikkel szemben hasonló védelmet nyújtanak, és ezért nevezzük ezt a rezisztencia típust nem rasszspecifikus más néven horizontális rezisztenciának (Van der Plank 1963). Megjelenése alapján pedig felnőttkori (Gustafson és Shaner 1982), de ez nem feltétlenül azonos a lassú sporulációt („slow rusting”) okozó (Caldwell 1968), részleges (Parlevliet 1975) vagy tartós rezisztenciával (Johnson 1984). A dolgot bonyolítja, hogy a felnőttkori ellenállóság is lehet rasszspecifikus. A nem rasszspecifikus rezisztencia megjelenését általában nem jelzik nekrotikus foltok, az ilyen rezisztencia génekkel rendelkező fajták rezisztenciája tartósabb, a kórokozó populáció egyes rasszainak szaporodása pedig korlátozott, de nem teljesen gátolt.

A nemesítők számára fontos a levélrozsa különböző rasszainak nyomon követése, és a rezisztenciagének hatékonyságának vizsgálata. A rezisztenciagének hatékonysága a jelen lévő és dinamikusán változó levélrozsa populáció összetételétől függ, miáltal a búzafajták rezisztenciája nem állandó tulajdonság. A levélrozsa populáció rasszösszetételének vizsgálatával meghatározható az egyes *Lr* gének hatékonysága az adott környezetben. Mesterházy és mtsai (2000) több európai ország bevonásával végezték el az európai rozsdapopuláció rasszösszetételének valamint a rezisztenciagének mind csíranövénykori mind felnőttkori hatékonyságának vizsgálatát. Eredményeik szerint Európaszerte az *Lr9* és *Lr19* gének voltak a leghatékonyabbak, mert egyetlen vizsgált levélrozsa izolátum sem fertőzte őket. Az *Lr24*, *Lr25* és *Lr28* gének szintén hatékonyak voltak, bár néhány országban találtak olyan levélrozsa izolátumot, amely kismértékű fertőződést okozott. Felnőttkorban hatékonyak találták az *Lr12*, *Lr13*, *Lr22a*, *Lr34*, *Lr35* és *Lr37* géneket. Csősz és mtsai (2000) Magyarországon szántóföldi természetes fertőzöttség alapján állapította meg az *Lr* gének felnőttkori hatékonyságát 1995 és 1999 között. Vizsgálataik során helyi különbségeket figyeltek meg, így például Szegeden az *Lr34* gént hatástalannak, míg Martonvásáron hatásosnak bizonyult. Dyck és Samborski (1979) szintén az *Lr34* gén hatékonyságának helyi különbségeiről számolt be. Martonvásári megfigyeléseik alapján Szunics és mtsai (2001) 1996 és 2000 között az *Lr34* gént felnőttkorban közepesen hatékonyak értékelték. Manninger (2000) szintén az *Lr34* felnőttkori hatékonyságát írja le magyarországi vizsgálatainak alapján. Az *Lr34* hatékonyságának különböző értékelését Dyck és Samborski (1979) azzal magyarázta, hogy e génekre jellemzőek a leveleken megjelenő kevesebb számú kis- és közepes méretű uredotelepek, míg a zászlósleveleken a levélnyelhez közel nagy uredotelepek jelenhetnek meg.

Jelenleg a nemesítők csak kevés őszi búza fajtáról tudják, hogy mely *Lr* gént vagy géneket hordozzák. A génazonosítási munkák többsége a fajták monospóráis ismert avirulenciagénekkel rendelkező levélrozsa izolátumokkal való fiatalkori mesterséges inokulációján alapul. Magyarországon ezzel a módszerrel Manninger (1996) levélrozsa rezisztencia gének meghatározására 20 elismert magyar fajtát vizsgált, és legnagyobb gyakorisággal (50%) az *Lr26* gént azonosította. Megtalálhatóak még a fajtákban az *Lr3*, *Lr34* és *Lr37* gének is önmagukban vagy kombinációban. Csősz (2008) a szegedi nemesítésű fajtákban azonosított levélrozsa rezisztencia géneket foglalta össze, amely szerint az *Lr3* gén előfordulása a leggyakoribb. Winzeler és mtsai (2000) 72 európai búzafajtában határozták meg az egyes *Lr* gének jelenlétét. Megállapították, hogy a több mint 50 ismert rezisztencia génből mindössze néhány fiatalkori (*Lr1*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr17b*, *Lr20* és *Lr26*), illetve felnőttkori rezisztenciát biztosító gén (*Lr13*, *Lr37*) fordul elő a fajtákban, külön-külön, vagy különböző génkombinációkban. A génkombinációk néhány kivételtől eltekintve hatástalannak voltak. Vagyis, a hatástalan gének

piramidálása igen gyakran nem vezet a kívánt eredményre. Az *Lr13*-at többnyire hatékony nem rasszspecifikus génnek írják le, viszont számos *Lr13*-al rendelkező fajta igen szélsőséges válaszokat adott (Winzeler és mtsai 2000).

Singh és mtsai (2001b) 70 angliai búzafajtában vizsgálták az *Lr* gének jelenlétét és megállapították, hogy a legelterjedtebb az *Lr13* (a fajták 57 %-ban megtalálható), az *Lr26* (22 %), az *Lr37* (20 %), az *Lr10* (17 %), az *Lr17b* (10%), az *Lr1* (7 %), az *Lr3a* (6 %) valamint az *Lr20* (4 %) gének. Pathan és Park (2006) 105 európai őszi búza fajtát vizsgált. A fajták 64%-ában jelen volt az *Lr13* és 18%-ában az *Lr26* gén, valamint kisebb százalékban (0,9-12%) az *Lr1*, *Lr3*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr14*, *Lr17b*, *Lr20* és *Lr37*. Hysing és mtsai (2006) észak-európai búzafajtákban (84 fajta vizsgálata) azonosították a levélrozsdá rezisztencia géneket. Megállapították, hogy a fajták 20 %-ában az *Lr13* gén a leggyakoribb, majd az *Lr14a* illetve *Lr26* gén (15-15%) fordul elő. Kisebb százalékban (1-10%) ugyan, de azonosították még az *Lr1*, *Lr2a*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr14* *Lr17b*, *Lr23* géneket is. Goyeau és Lannou (2011) az 1983 és 2007 közötti időszakban Franciaországban termelt 275 búzafajtában tanulmányozták az *Lr* gének gyakoriságát, amelynek során az *Lr13*, *Lr37*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr3*, *Lr26*, *Lr1*, *Lr24* és *Lr20* géneket azonosították, 67%, 45%, 34%, 20%, 8%, 7%, 6%, 1%, és 1% gyakorisággal. A példákából jól látszik, hogy az európaszerte elterjedt őszi búza fajtákban mindössze néhány (*Lr1*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr17b*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr37*) *Lr* gén fordul elő, ráadásul igen eltérő gyakorisággal — egyes gének gyakorisága (pl. *Lr20*) igen alacsonynak bizonyult. A világ más tájain is végeztek hasonló vizsgálatokat, így pl. Singh és mtsai (2001c) 30 japán búzafajtát teszteltek ismert levélrozsdá rezisztencia gének azonosítására szolgáló levélrozsdá izolátumokkal. Összesen 9 *Lr* gént és egy génkombinációt azonosítottak: *Lr1* (6%), *Lr3* (10%), *Lr9* (30%), *Lr10* (16%), *Lr17* (3%), *Lr23* (26%), *Lr27+31* (10%) — feltűnő az *Lr9* és *Lr23* gének magas aránya (ezeket a fenti európai vizsgálatok során nem sikerült kimutatni).

A nemesítők már régóta törekednek arra, hogy a búzafajtákban tartós rezisztenciát alakítsanak ki. Itt több lehetőség is van. A hatásos rezisztenciagéneket (rassz vagy nem rasszspecifikus gének) önmagukban, vagy egymással kombinálva is lehet használni. Singh és mtsai (2000) megfigyelték, hogy azok a búzafajták, amelyekben az *Lr13*, *Lr34* és *Lr46* vagy más felnőttkori rezisztencia gének génkombinációban fordulnak elő, sokkal rezisztensebbek, mintha ugyanezen géneket önmagukban alkalmazzák. Itt azonban kérdés, hogy ez a kölcsönhatás-e az ok, vagy egy további ismeretlen gén vagy QTL áll a jelenség mögött. Szintén jó megoldás a tartós rezisztencia elérése érdekében, ha a felnőttkori rezisztencia gént csíranövénykorban hatékony rezisztencia génnel vagy génekkel kombinálják (Kolmer és Oelke 2006). Néhány esetben előfordul, hogy hatástalan rasszspecifikus rezisztenciagéneket kombinálnak/halmoznak egy búzafajtában, de ez a rasszspecifikus rezisztencia gének szinergetikus hatását feltételezi.

Levélrozsánál csak két gén esetében (*Lr27* és *Lr31*) bizonyították ezt (Singh és McIntosh 1984a, b).

Több, akár különböző hatékonysággal bíró rezisztenciagén egy fajtába történő beépítése azonban nem könnyű feladat. A hagyományos szelekciós módszerek alkalmazásával elkerülhetetlen a levélrozsda rasszok fenntartása és a nemesítési vonalak mesterséges fertőzése. Ezzel a módszerrel azonban egynél több hatékony rezisztencia gén nyomon követése igen nehéz feladat, hiszen hasonló hatásuk, tünetük miatt egyszerű módon nem különíthetők el. Az egyes *Lr* gének térképezésének és a búza genomikai kutatásainak köszönhetően azonban a génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerekkel mára jelentősen könnyebbé vált az adott fajtákban az egyes rezisztenciagének egymástól független meghatározása. A rezisztencia-nemesítésben ez által a MAS is új lehetőségeket kínál - segítségével egyszerre több gén beépítése is nyomon követhető az adott fajtába. A munka hatékonyságát növeli, ha egy-egy rezisztencia génhez több, minél közelebbi kapcsoltságú molekuláris marker áll a nemesítők rendelkezésére, továbbá az esetleges rekombináció kiszűrése érdekében a folyamat végén fenotípusos rezisztencia vizsgálat is szükséges.

### **2.3 A búza levélrozsda rezisztencia génekkel kapcsolatos öröklődő markerek azonosítása - térképezési populációk**

A genetikai térképezés elengedhetetlen feltétele a megfelelő térképezési populáció létrehozása és fenntartása. Ahhoz, hogy egy számunkra fontos tulajdonságot térképezni tudjunk, a keresztezéshez használt szülőket úgy kell kiválasztanunk, hogy azok a térképezni kívánt tulajdonságban lényegesen eltérőek legyenek (pl. jelen esetben levélrozsda rezisztens illetve fogékony). A térképezési populáció kialakításánál figyelembe kell venni a vizsgált tulajdonság jellegét (domináns vagy többgénes öröklődésű) és a vizsgálat ismételtetésének igényét is (Galiba 2006). A fenotipizálás minősége kulcskérdés. Ideális esetben, pl. a levélrozsda üvegházi tesztnél a teljes populációt egyidőben lehet inokulálni, míg a szántóföldi tesztnél a populáció heterogenitása kalászosítás és egyéb tekintetben okozhat problémákat. A kísérletet több ismétlésben kell elvégezni, hogy a kívánt tulajdonság minél pontosabban meghatározható legyen. A molekuláris markerek azonosításának legegyszerűbb módja két egymástól élesen elkülönülő fenotípusú (pl. levélrozsda rezisztens illetve fogékony) fajta közötti eltérő DNS-sávmintázat keresésén alapul.

A genetikai térképezés történhet a két fajta keresztezésével előállított szegregáló  $F_2$  populáció segítségével. Ez elvileg egyszerű, de a fajták a térképezni kívánt génnel nem allélos géneket, DNS szekvenciákat is hordozhatnak, amelyek szintén polimorf mintázatot eredményezhetnek. A



genetikai térképezéskor ilyenkor előfordulhat, hogy a viszonylag nagyszámú markerjelölt közül mindössze néhány lesz szorosan kapcsolt az adott tulajdonsággal. A vizsgálatot zavaró hatások kizárása érdekében ezért két olyan mintát érdemes választani, amelyekben a vizsgált gén kivételével a genetikai háttér azonos vagy majdnem azonos. Monogénesen öröklődő tulajdonságok kapcsolt markereinek térképezéséhez ezért olyan  $F_2$  populációkat alkalmaznak, amelyeket NIL-ek illetve eltérő fenotípusú szülők keresztezésével hoznak létre (az utóbbi populációkban a molekuláris markereket BSA-sel azonosítják).

A NIL-ek előállításakor a recipiens szülővel 5-8 szori visszakereszteztést végezve a folyamat végén a donorszülő véraránya már az 1 illetve 0,1%-ot sem haladja meg. A vonalak közötti különbséget az adja, hogy a donorból származó kromoszómaszegmenten nemcsak a kívánt gén, hanem más eltérő DNS-szekvenciák is találhatóak, amelyeket, mint a génnel együtt öröklődő, kapcsolt molekuláris markereket azonosíthatunk. Két közel izogén vonal közt DNS szinten kimutatott polimorfizmusról erősen feltételezhető, hogy szorosan kapcsolt a célgénnel (Purnhauser 2006).

Történetileg a *Lr* génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek azonosításhoz elsőként a NIL-ek keresztezésével előállított  $F_2$  és  $F_3$  populációkat használták. Betegségrezisztencia gén térképezésénél szükség van a szegregálódó populáció előzetes fenotipizálására, amely az adott rezisztencia génre avirulens és a fogékony egyedekre virulens kórokozó rasszal történő fertőzés mértékének meghatározását jelenti. A rezisztenciával szoros kapcsoltságban lévő molekuláris marker hasadása az  $F_2$  populációban szorosan követi a fenotípusos hasadást (koszegregáció). Számos rasszspecifikus *Lr* génhez szorosan kapcsolt különböző típusú molekuláris markert azonosítottak  $F_2$  térképezési populáció segítségével: így az *Lr1* (Feuillet és mtsai 1995), *Lr3* (Sacco és mtsai 1998), *Lr19* (Cherukuri és mtsai 2003, Gupta és mtsai 2006), *Lr20* (Neu és mtsai 2002), *Lr21* (Huang és mtsai 2001), *Lr22a* (Hiebert és mtsai 2007), *Lr24* (Schachermayr és mtsai 1995), *Lr39* (Raupp és mtsai 2001), *Lr52* (Hiebert és mtsai 2005) gének markereit is.

A NIL-ek hátránya, hogy előállításuk idő- és munkaigényes folyamat, ezért ha ilyen vonalak nem állnak rendelkezésünkre, akkor szintén sikerrel alkalmazható az adott tulajdonsággal szoros kapcsoltságban öröklődő molekuláris markerek azonosítására a BSA módszer, amit Michelmore és mtsai (1991) dolgoztak ki liztharmat rezisztencia génekhez kapcsolt markerek azonosítására salátában. A módszer lényege, hogy először az adott tulajdonságra hasadó  $F_2$  populációt hoznak létre, majd a fenotípusosan két legeltérőbb csoport egyedeit kiválasztják, azok DNS mintáit csoportonként összeöntik, és ezeket használják tovább polimorf markerjelöltek azonosítására. A két keverékben így az eredeti  $F_2$  populációban jelenlevő gének gyakorlatilag azonos eséllyel fordulnak elő (ezekre nem történt szelekció), különbség csak a keresett *Lr* génnél jelentkezik (szelektált rezisztens ill. fogékony egyedek DNS keveréke). A kapcsoltság igazolása és mértékének meghatározása ennél a

módszernél is a teljes populáció bevonásával történik. William és mtsai (2003) ezt a módszert alkalmazták búzában az *Lr46* génhez kapcsolt molekuláris marker azonosítására.

Bár az  $F_2$  populációkkal is lehet sikeresen dolgozni, elsősorban a monogénes tulajdonságok esetében, a QTL-ek térképezésére célszerűbb olyan populációkat előállítani, amelyek stabilan fenntarthatóak és korlátlanul szaporíthatóak. Ezek közé tartoznak a RIL-ek és a DH vonalakból álló térképezési populációk. A RIL-eket általában SSD módszerrel állítják elő, amelynek lényege, hogy az  $F_1$  nemzedék öntermékenyítése után minden növényről minden generációban mindössze egy-egy szemet vetnek el, és 6-8 generáción keresztül öntermékenyítést végeznek (Mohan és mtsai 1994). Az egyes vonalak genetikailag homogének és állandóak lesznek, mivel az utolsó öntermékenyítés után a növények szinte minden lókusza homozigótáknak tekinthetők, így a populáció genetikailag rögzített formában korlátlanul szaporítható. Bár a RIL-ek előállítása hosszadalmas folyamat, de ha már rendelkezésre állnak, akkor lehetővé válik ugyanannak a térképezési populációnak több helyen és éven át való vizsgálata is - ez QTL vizsgálatoknál elengedhetetlen. Ezt a módszert alkalmazták Bossolini és mtsai (2006) az *Lr34* génhez kapcsolt kodomináns marker azonosítására. A DH vonalak adják a leghomogénebb vizsgálati anyagot, mert az  $F_1$  nemzedék mikrospóráiból fejlődő haploid növények diploidizálásával állítják elő. Előállításuk rövidebb időt vesz igénybe, alkalmazásukban azonban problémát jelenthet, ha nincs az adott növényfajra kidolgozott és rutinszerűen alkalmazható mikrospóra illetve portoktenyészítés alapú növényregenerálási rendszer.

## **2.4 A búza levélrozsda rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerek típusai**

A rezisztencianemesítés során több, akár különböző hatékonysággal bíró rezisztenciagén egy fajtába történő beépítése nem könnyű feladat. A hagyományos szelekciós módszerek alkalmazásával elkerülhetetlen a levélrozsda rasszok fenntartása és a nemesítési vonalak mesterséges fertőzése. Ezzel a módszerrel azonban egynél több rezisztencia gén nyomon követése igen nehéz, hiszen hasonló hatásuk, tünetük miatt egyszerű módon nem különíthetők el. Az egyes *Lr* gének térképezésének és a búza genomikai kutatásainak köszönhetően azonban a génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerekkel mára viszonylag könnyűvé vált az adott fajtában az egyes rezisztenciagének egymástól független meghatározására. A rezisztencianemesítésben a molekuláris markerek ezáltal új lehetőséget kínálnak, hiszen a MAS segítségével egyszerre több rezisztencia gén beépítése is nyomon követhető az adott törzsekben. Szintén fontos megemlíteni, hogy egy-egy génhez kapcsolt

nagyszámú molekuláris marker nem csak a szelekció idejét rövidíti le és teszi könnyebbé, hanem a finomtésképezés révén kiinduló pontot jelenthet a gének klónozásához (Feuillet és mtsai 2003; Huang és mtsai 2003; Ling és mtsai 2003). Az utóbbi évtizedekben számos különböző típusú molekuláris markerezési technikát írtak le, és alkalmaztak az *Lr* génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek azonosítására.

Korábban a legszélesebb körben elterjedt technika a genomiális DNS restriktációs enzimekkel történő emésztésén és a Southern-hibridizáción alapuló RFLP (Botstein és mtsai 1980) volt. E módszer alkalmazásával hozták létre az első, jó felbontású kapcsoltsági térképeket a hexaploid búza hét homeológ kapcsoltsági kromoszóma csoportja között (Chao és mtsai 1989; Devos és mtsai 1993; Marino és mtsai 1996; Nelson és mtsai 1995; Xie és mtsai 1993). Az RFLP módszer, ill. a marker előnye, hogy a templát DNS szekvenciájának előzetes ismeretét nem igényli, kodominánsan öröklődik, jól ismételhető és megbízható. Hátránya viszont, hogy nagy mennyiségű DNS-t igényel, a Southern-hibridizációhoz fluoreszcensen vagy radioaktívan jelölt próbát kell előállítani, amely hosszadalmas és költséges eljárás, csak nagyon kisszámú polimorfizmus detektálására alkalmas, ráadásul egészségre veszélyes radioaktív izotópok használatát is igényli (Devos és Gale 1992; Röder és mtsai 1998). Számos *Lr* génhez kapcsolt RFLP markert azonosítottak (2. táblázat). Az egyszerűbb felhasználás érdekében az RFLP markereket általában PCR alapú STS markerekké alakítják át oly módon, hogy a polimorf fragmentumokat szekvenálják, majd a szekvenciák alapján szekvenspecifikus oligonukleotid primerpárokat terveznek (Olson és mtsai 1989). STS markereket az *Lr1* (Feuillet és mtsai 1995) génhez kapcsoltan írtak le.

Az RFLP módszerhez képest a PCR alapú technikák (pl. RAPD, STS, SCAR, AFLP, RGAP, SSR) általában jóval gyorsabbak, olcsóbbak és esetleg automatizálható detektálást tesznek lehetővé (Gupta és mtsai 1999; Korzun 2002; Landjeva és mtsai 2007, Purnhauser és mtsai 2008).

A RAPD módszert egyidejűleg két kutatócsoport (Williams és mtsai 1990, Welsh és McClelland 1990) publikálta. Ez a módszer egy általában 10 bp hosszúságú primerrel felszaporított DNS fragmentumok hosszának polimorfizmusán alapul. Az egyedek vagy vonalak közötti polimorfizmust a primer kötőhelyének DNS-szekvencia különbsége, valamint az amplifikált régióban vagy a primer kapcsolódási helyén létrejövő báziscsere, delécio, inszercio vagy inverzió okozhatja. A RAPD markerek domináns öröklődésűek, genetikai térképek létrehozására, genetikai variabilitás kimutatására, rezisztencia gének térképezésére is felhasználhatóak (Gupta és mtsai 1999). Egyszerű alkalmazhatóság mellett a RAPD módszer hátránya a viszonylag gyenge ismételhetőség és megbízhatóság. A RAPD markerek szekvenspecifikus SCAR (Paran és Michelmore 1993) markerekké alakíthatók át az STS módszernél leírtak szerint. Sorosan kapcsolt SCAR markereket fejlesztettek ki az *Lr9* (Schachermayr és mtsai 1994), *Lr19*

(Cherukuri és mtsai 2003), *Lr24* (Schachermayr és mtsai 1995; Dedryver és mtsai 1996), *Lr28* (Naik és mtsai 1998) gének esetében (2. táblázat).

Az AFLP módszer specifikus restrikciós enzimek által hasított DNS fragmentumok szelektív PCR amplifikációján alapszik (Vos és mtsai 1995). Nagyszámú polimorf fragment detektálására alkalmas. Az AFLP markerek szintén domináns jellegűek és szekvenciaspecifikus SCAR markerekké konvertálhatók (Shan és mtsai 1999). Számos *Lr* gén, így az *Lr19* (Prins és mtsai 2001), és az *Lr46* (William és mtsai 2003) gén kapcsolt AFLP markerei ismertek (2. táblázat).

Az RGAP (Chen és mtsai 1998) módszer alapja, hogy a különböző növényfajok sokféle patogénnel szembeni rezisztencia génjei nagyfokú strukturális konzervatizmussal rendelkeznek (NBS és LRR szekvenciák). Ezekre a szekvenciákra tervezett specifikus primerek által a polimorf markerek azonosíthatók. Az *Lr21* (Huang és mtsai 2001) és az *Lr37* (Seah és mtsai 2001) génekhez kapcsolt RGAP markerek ismertek (2. táblázat).

Az SSR (Condit és Hubell 1991) egyszerű szekvencia (6 nukleotidnál rövidebb) tandem ismétlődései (ismétlődések száma általában 5 és 30 között változik), amelyek a legtöbb eukarióta genomban véletlenszerűen fordulnak elő. SSR-ek határszekvenciáira tervezett szekvenciaspecifikus primerpárok PCR amplifikálásával mutathatók ki. Az SSR szekvenciák meghatározása és a szekvenciaspecifikus primerek tervezése idő-, költség- és munkaigényes folyamat. Röder és mtsai (1998) írták le az első SSR markereket tartalmazó genetikai térképet, amelyre 230 mikroszatellit primer által amplifikált 279 lokuszt térképeztek a hexaploid búza kromoszómáin. Stephenson és mtsai (1998) további 50 mikroszatellit lókusszal egészítette ki ezt a genetikai térképet. Napjainkra a hexaploid búzában már több ezer mikroszatellit markert térképeztek (Gupta és mtsai 2002; Guyomarc'h és mtsai 2002; Somers és mtsai 2004; Song és mtsai 2002). Az SSR markerek amplifikációjához szükséges primerek szekvenciája, valamint a térképezési adatok a Grain Genes búza adatbázis honlapján (<http://wheat.pw.usda.gov>) bárki számára hozzáférhetőek. Az SSR markerek kromozómaspecifikussága, kodomináns öröklődése, hipervariabilitása és a módszer jó ismételhetősége következtében ez a technika igen kedvelt a búza *Lr* gének azonosításában. Eddig a búza *Lr1* (Ling és mtsai 2003), *Lr13* (Seyfarth és mtsai 2000), *Lr16* (McCartney és mtsai 2005), *Lr17* (Barett és mtsai 2008), *Lr19* (Gupta és mtsai 2006), *Lr22a* (Hiebert és mtsai 2007), *Lr28* (Vikal és mtsai 2004), *Lr34* (Suenaga és mtsai 2003; Schnurbush és mtsai 2004b; Bossolini és mtsai 2006), *Lr37* (Blaszczyk és mtsai 2005), *Lr38* (Mebrate és mtsai 2008), *Lr39* (Raupp és mtsai 2001), *Lr41* (Sun és mtsai (2009), *Lr48*, *Lr49* (Bansal és mtsai 2008), *Lr50* (Brown-Guedira és mtsai 2003), *Lr52* (Hiebert és mtsai 2005; Tar és mtsai 2008) *Lr* génjeit azonosították és térképezték SSR technikával (2. táblázat). Az SSR markerek kapcsoltsági térképeinek ismerete és kromozómaspecifikussága lehetőséget nyújt továbbá arra is, hogy egy-egy új rezisztencia gén pontos helye meghatározható és

térképezhető legyen a búza kromoszómák valamelyikére. Az *Lr52* rezisztencia gént először a hexaploid búza 4A kromoszómájára térképezték (Hiebert és mtsai 2002), majd egy F<sub>2</sub> populációt különböző kromoszómákra specifikus SSR markerekkel vizsgáltak, és megállapították, hogy a rezisztencia gén az 5BS kromoszómán helyezkedik el (Hiebert és mtsai 2005).

**2. táblázat.** *Lr* gének helye a genomban és az azonosított molekuláris markerek típusa, irodalma

Rezisztenciagén	Kromoszóma	Molekuláris marker típusa	Irodalom
<i>Lr1</i>	5DL	RFLP, STS	Feuillet és mtsai 1995
		SSR	Ling és mtsai 2003
		RGAP	Qiu és mtsai 2007
<i>Lr3</i>	6BL	RFLP	Sacco és mtsai 1998
<i>Lr9</i>	6BL	RFLP	Autrique és mtsai 1995
		RFLP	Schachermayr és mtsai 1994
		RAPD, SCAR	Schachermayr és mtsai 1994
<i>Lr10</i>	1AS	RFLP	Nelson és mtsai 1997
		STS	Schachermayr és mtsai 1997
<i>Lr12</i>	4BL	SSR	Singh és mtsai 2011
<i>Lr13</i>	2BS	SSR	Seyfarth és mtsai 2000
<i>Lr14</i>	6B	SSR	Herrera-Foessel 2008
<i>Lr15</i>	2DS	SSR	Gupta és mtsai 2008
<i>Lr16</i>	2BS	SSR	McCartney és mtsai 2005
<i>Lr17</i>	2AS	SSR	Barett és mtsai 2008
<i>Lr19</i>	7DL	RFLP	Autrique és mtsai 1995
		AFLP, STS	Prins és mtsai 2001
		RAPD, SCAR	Cherukuri és mtsai 2003
		RAPD, SSR	Gupta és mtsai 2006
<i>Lr20/Pm1</i>	7AL	RFLP, STS	Neu és mtsai 2002
<i>Lr21 (Lr40)</i>	1DS	RGA-STS	Huang és mtsai 2001
<i>Lr22a</i>	2DS	SSR	Hiebert és mtsai 2007
<i>Lr23</i>	2BS	RFLP	Nelson és mtsai 1997

<b>Rezisztenciagén</b>	<b>Kromoszóma</b>	<b>Molekuláris marker típusa</b>	<b>Irodalom</b>
<i>Lr24</i>	3DL	RFLP	Autrique és mtsai 1995
		RAPD, SCAR	Schachermayr és mtsai 1995
		RAPD, SCAR	Dedryver és mtsai 1996
<i>Lr25</i>	4BS	RAPD	Procunier és mtsai 1995
		SSR	Singh és mtsai 2012
<i>Lr26/Sr31/Yr9</i>	1BL-1RS	STS	De Froidmont 1998
		STS	Nadella és mtsai 2002
		S-SAP	Nagy és mtsai 2003
<i>Lr27</i>	3BS	RFLP	Nelson és mtsai 1997
<i>Lr28</i>	4AL	RAPD, SCAR	Naik és mtsai 1998
		SSR	Vikal és mtsai 2004
		RAPD-SCAR	Cherukuri és mtsai 2005
<i>Lr29</i>	7DS	RAPD	Procunier és mtsai 1995
<i>Lr31</i>	4BS	RFLP	Nelson és mtsai 1997
<i>Lr32</i>	3DS	RFLP	Autrique és mtsai 1995
<i>Lr34/Yr18</i>	7D	RFLP	Nelson és mtsai 1995
		RFLP	Nelson és mtsai 1997
		RAPD	William és mtsai 1997
		SSR	Suenaga és mtsai 2003
		SSR	Schnurbusch és mtsai 2004b
		SSR	Bossolini és mtsai 2006
		RFLP, STS	Lagudah és mtsai 2006
<i>Lr35/Sr39</i>	2B	ISSR, SCAR	Gold és mtsai 1999
		STS	Seyfart és mtsai 1999
<i>Lr37/Yr17/Sr38</i>	2AS	SCAR	Robert és mtsai 1999
		RGAP	Seah és mtsai 2001
		CAPS	Helguera és mtsai 2003
		SSR	Blaszczyk és mtsai 2005
		RAPD	Mumtaz és mtsai 2009
<i>Lr38</i>	4BS	SSR	Mebrate és mtsai 2008

<b>Rezisztenciagén</b>	<b>Kromoszóma</b>	<b>Molekuláris marker típusa</b>	<b>Irodalom</b>
<i>Lr39</i>	2DS	SSR	Raupp és mtsai 2001
<i>Lr41</i>	1D	SSR	Sun és mtsai 2009
<i>Lr46/Yr29</i>	1B	AFLP	William és mtsai 2003
		STS	Mateos-Hernandez és mtsai 2006
<i>Lr47</i>	7AS	CAPS	Helguera és mtsai 2000
<i>Lr48</i>	2BS	SSR	Bansal és mtsai 2009
		RAPD	Samsampour és mtsai 2010
		SSR	Singh és mtsai 2011
<i>Lr49</i>	4BL	SSR	Bansal és mtsai 2009
<i>Lr50</i>	2BL	SSR	Brown-Guedira és mtsai 2003
<i>Lr51</i>	1BL	CAPS	Helguera és mtsai 2005
<i>Lr52</i>	5BS	SSR	Hiebert és mtsai 2005
		SSR, STS, RAPD	Tar és mtsai 2008
<i>Lr60</i>	1D	SSR	Hiebert és mtsai 2008
<i>Lr67</i>	4DL	SSR	Herrera-Foessel és mtsai 2011
<i>Q<sub>Lr</sub>.Osu-2B</i> <i>Q<sub>Lr</sub>.Osu-7BL</i>	2B, 7BL	AFLP	Xu és mtsai 2005
<i>LrZH84</i>	1B	SSR	Zhao és mtsai 2008

## 2.5 A levélrozsda rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerek alkalmazása a nemesítésben

A molekuláris markerek alkalmazásának lehetőségei a nemesítésben Collard és Mackill (2008) szerint az alábbiakban foglalható össze: nemesítési törzsek, fajták azonosítása; különböző tulajdonságokat meghatározó gének azonosítása a fajtákban; szelekció elősegítése a génpiramidálás során (MAS). A MAS programokban alkalmazott molekuláris markerekkel szemben az alábbi igények merülnek fel:

- a kívánt génnel együtt szegregáljanak vagy szoros genetikai kapcsoltságot mutassanak,

- lehetőleg kodomináns öröklődésűek legyenek a homozigóta és heterozigóta egyedek azonosítása végett,
- az alkalmazni kívánt marker olyan technikán alapuljon, mely széles körben elterjedt, felhasználóbarát, hogy velük nagy egyedszámú populációt is lehessen viszonylag könnyen, gyorsan és olcsón megvizsgálni viszonylag rövid időn belül,
- laboratóriumoktól függetlenül jól ismételhetőek legyenek,
- különböző genetikai háttér esetén is jól detektálhatóak legyenek (markerek validálása).

E szempontok alapján erre a célra jelenleg legalkalmasabb az SSR marker, de gyakran használják még az STS és SCAR markereket is. A markerre alapozott nemesítési stratégia a nemesítésben ismert visszakeresztezési sémán alapul, amelynek során a donor növényt a recipienssel keresztezzük, majd 4-5 nemzedéken keresztül a recipienssel visszakereszteezést végzünk. Az egyes ciklusok során a kívánt gént hordozó egyedeket már csíranövénykorban szelektálhatjuk a markerek segítségével. A visszakereszteezések során az agronómiailag kedvezőtlen tulajdonságokat hordozó donor genetikai részaránya egyre csökkenő mértékben vesz részt az utódok kialakításában. A visszakeresztezési folyamat végén öntermékenyítést végzünk, és az utódok közül a kívánt gént homozigóta állapotban hordozó egyedet kiválasztva genetikailag stabil vonalat állíthatunk elő. Ha egyszerre több gént kívánunk átvenni (génpiramidálás) a recipiens vonalba, akkor a visszakereszteezések előtt kombinált keresztezést végzünk a donor vonalak és a recipiens között, vagy a kívánt génekre először közel izogén vonalakat hozunk létre, majd ezeket egymással keresztezve molekuláris markerek segítségével kiválogatjuk a kívánt géneket együttesen hordozó egyedeket az utódok közül (Purnhauser 2006).

Az *Lr* génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek nemesítésben való alkalmazására 2001-ben, az USA-ban létrejött az egyik legismertebb konzorcium, „MASwheat” néven J. Dubcovsky vezetésével. A felhasznált molekuláris markerek és módszertani leírások a projekt állandóan frissülő honlapján érhetők el (<http://maswheat.ucdavis.edu>) (Dubcovsky 2004).

Az *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr29*, *Lr35* génekhez kapcsolt STS markerek és az *Lr39* génhez kapcsolt SSR marker validálását végezték el Blaszczyk és mtsai (2004) 7 európai laboratórium bevonásával. Megállapították, hogy az ismertett gének markerei alkalmasak a markerre alapozott szelekcióra, mert a laboratóriumoktól függetlenül detektálhatóak voltak. Szintén Blaszczyk és mtsai (2008) az ismertett kísérlethez hasonlót végeztek el további rezisztencia gének bevonásával.

Kuchel és mtsai (2007) két *Lr* gén (*Lr34* és *Lr46*) fogékony fajtákba való átviteléről számoltak be a markerre alapozott szelekció segítségével. Hagyományos, a recipiens fajttal történő visszakeresztezéses módszerrel indították programukat. A BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> populáció egyedeit az *Lr34* génhez kapcsolt



SSR (Suenaga és mtsai 2003) és az *Lr46* génhez kapcsolt SSR (Rosewarne és mtsai 2006) markerek jelenlétére tesztelték. Azokból az egyedekből, amelyekben amplifikálódott a rezisztencia gén jelenlétére utaló marker dihaploid vonalakat állítottak elő a rezisztencia gének homozigóta állapotban való fixálására.

Vida és mtsai (2009) Magyarországon 6 (*Lr9*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr37*) *Lr* gén átviteléről számolt be 4 martonvásári nemesítésű fajtába. Céljuk nemcsak olyan törzsek előállítását volt, amelyek egy-egy rezisztencia gént hordoznak a MAS program végére, hanem ugyanazon törzsből több rezisztencia gén halmozását, piramidálását valósították meg. Programjukban sikerrel hoztak létre olyan törzseket, amelyek az *Lr9+Lr24*, *Lr9+Lr25*, *Lr9+Lr29* génkombinációkat hordozzák.

A rezisztencia génekhez kapcsolt molekuláris markerek alkalmazásának másik lehetősége a rezisztencia gének azonosítása az ismeretlen genetikai hátterű fajtákban. Például Vida és mtsai (2009) nemcsak markerre alapozott szelekciós programjukban alkalmazták a különböző molekuláris markereket, hanem az *Lr34* gén azonosítására is martonvásári nemesítésű fajtákban. Stepien és mtsai (2003) 37 európai búzafajta vizsgálatát végezték el az *Lr10*, *Lr26* és *Lr37* gének azonosítása céljából molekuláris markerek segítségével. A molekuláris markerek jelenlétét összevetették a Winzeler és mtsai (2000) közölt fenotípusos adatokkal, és megállapították, hogy e gének azonosíthatók a markerek segítségével is. Kolmer és mtsai (2008) az *Lr34* rezisztencia gén azonosítását végezték el a *XcsLV34* (Lagudah és mtsai 2006) STS markerrel észak- és dél-amerikai, CIMMYT, ausztrál, európai és orosz fajtákban.



### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1 Molekuláris markerek azonosítására használt növényanyag

Molekuláris markerek azonosítására az *Lr20* gént hordozó RL6092 (Thatcher\*6/Timmo) (rövidítve: NIL *Lr20*) az *Lr52* gént hordozó RL6107 (Thatcher\*6/V336), (rövidítve: NIL *Lr52*), NIL-eket, valamint a Thatcher és a GK Délibáb fogékony fajtákat használtuk. A NIL-eket és a Thatcher fajtát Dr. James Kolmer (Winnipeg, Kanada, most St. Paul, MN, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A molekuláris markerek és a rezisztencia gének kapcsoltságának vizsgálatához és a genetikai térképezéshez a NIL *Lr20*/GK Délibáb valamint a NIL *Lr52*/GK Délibáb keresztezésből 119 illetve 267 F<sub>2</sub> egyedből álló populációt hoztunk létre.

#### 3.2 Az F<sub>2</sub> populációk növényeinek inokulációja és fenotípusos vizsgálata

A levélrozsda uredospórákat tartalmazó izolátumot Csősz Lászlóné (Gabonakutató Kft.) állította elő és bocsátotta rendelkezésemre. A monospóras levélrozsda izolátum patotípusba sorolását a COST 817-es munkacsoportja keretében kialakított 15 vonalból álló differenciáló tesztszortiment és Csősz (2007) által kiegészített további 23 NIL segítségével végeztük el (3. és 4. táblázat). A monospóras levélrozsda izolátum triplet kódját Limpert és Müller (1994) módszere alapján írtuk le: a differenciáló tesztszortimentet 3-3 vonalat tartalmazó csoportba soroltuk. A tripletéken belül 1, 2 és 4 kódot használtunk. A monospóras izolátumok patotípusba sorolása a tripletén belüli számkódok összevonásából következik. Ha a monospóras izolátum a tripletén belüli génekre avirulens, akkor az adott triplet kódja 0; ha az 1. és 2. génre virulens, akkor a kód 3; ha az 1. és 3. génre virulens, akkor a kód 5; ha a 2. és 3. génre virulens, akkor a kód 6; ha pedig mindhárom génre virulens, akkor a kód 7. E szerint az *Lr20* és *Lr52* gén jellemzésére az F<sub>2</sub> populációkban általunk alkalmazott monospóras izolátum kódja: 02000-04722700 (3. és 4. táblázat).

**3. táblázat.** A nemzetközi levélrozsa differenciáló tesztszortimentben szereplő 15 Thatcher alapú közel izogén vonal, a rezisztencia gének és ezek kódszámai a triplet kód (Limpert és Müller 1994) alapján

Megnevezés	Gének	Kód	Reakció
Tc*6/Centenario	<i>Lr1</i>	1	R
Tc*6/Webster	<i>Lr2a</i>	2	R
Tc*6/Carina	<i>Lr2b</i>	4	R
Tc*6/Loros	<i>Lr2c</i>	1	R
Tc*6/Democrat	<i>Lr3</i>	2	S
Transfer/Tc*6	<i>Lr9</i>	4	R
Tc*2/Hussar	<i>Lr11</i>	1	R
Tc*6/W1483	<i>Lr15</i>	2	R
Klein Lucero/Tc*6	<i>Lr17</i>	4	R
Tc*7/Translocation 4-Agropyron elongatum	<i>Lr19</i>	1	R
Tc*6 RI5406 Tetra Cantach x Ae. squarrosa var meyeri-RL 5289	<i>Lr21</i>	2	R
Lee 310/Tc*6	<i>Lr23</i>	4	R
Tc*6/Agent	<i>Lr24</i>	1	R
Tc*6/St-1-25	<i>Lr26</i>	2	R
Tc*6/C-77-1	<i>Lr28</i>	4	R

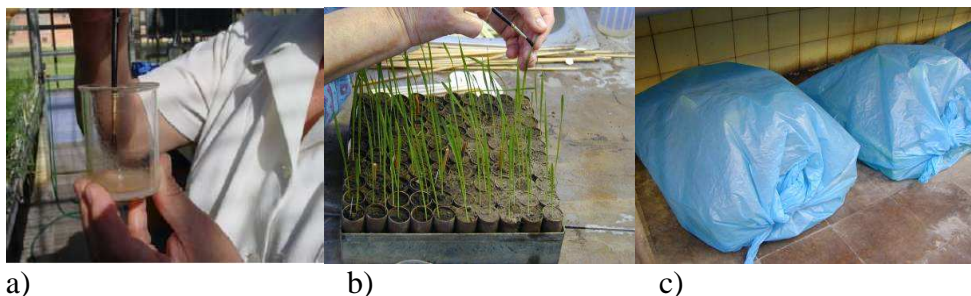
**4. táblázat.** Az *Lr20* és *Lr52* rezisztencia génekre avirulens patotípus jellemzése 23 közel izogén vonal segítségével

Megnevezés	Gének	Kód	Reakció
Bage/Tc*8	<i>Lr3bg</i>	1	R
Tc*6/Aniversario	<i>Lr3ka</i>	2	R
Tc*6/Exchange	<i>Lr10</i>	4	R
Exchange/Tc*6 adult plant resistance	<i>Lr12</i>	1	R
Tc*6/Frontana	<i>Lr13</i>	2	R
Selkirk/Tc*6	<i>Lr14a</i>	4	S
Tc*6/Mario Escobar	<i>Lr14b</i>	1	S
Tc*6/Exchange	<i>Lr16</i>	2	S
Tc*7/Africa 43	<i>Lr18</i>	4	S
Tc*6/Timmor	<i>Lr20</i>	1	R
Tc*6/RL 5404 Tetra Canthatch X Ae. Squarrosa var. strangulata-RL5271	<i>Lr22</i>	2	S
Tc*6/Transec	<i>Lr25</i>	4	R
Tc*6/CS7D-Ag#11	<i>Lr29</i>	1	R
Tc*6/Terenzio	<i>Lr30</i>	2	S
Tc*6/3/Ae. Squarrosa	<i>Lr32</i>	4	R
Tc*6/PI 58548 (1+gene)	<i>Lr33</i>	1	S
Tc*6/PI 58548 (1+gene)	<i>Lr34</i>	2	S
Tc*8/VPM	<i>Lr37</i>	4	S
Tc*6/T7 Kohn	<i>Lr38/K</i>	1	R
Tc*6/TMR-514-12-24	<i>Lr38/TMR</i>	2	R
Tc*6/T. spelt	<i>Lr44/T.spelt</i>	4	R

Megnevezés	Gének	Kód	Reakció
Tc*6/8404	<i>Lr44/8404</i>	1	R
Tc*6/Carina	<i>LrB</i>	2	R
Tc*6/V336	<i>Lr52</i>	4	R

Forrás: Csósz (2007)

A NIL *Lr20*/GK Délibáb valamint a NIL *Lr52*/GK Délibáb keresztezéséből létrehozott F<sub>2</sub> populációk egyedeit és a kontroll növényeket (NIL *Lr20*, NIL *Lr52*, GK Délibáb, Thatcher) 7 napos csíranövény korban inokuláltuk az előbbieken leírt levélrozsdá razzsal. Az inokulálást Csósz (2007) által leírt módszer alapján végeztük. Ennek során a levélrozsdá uredospórákkal keményítőszuszpenziót készítettünk, amelyet a csíranövények első levelére ecsettel kentünk fel, majd a 100 %-os relatív páratartalom biztosítása érdekében polietilén zacskót húztunk a növényekre (5. ábra). A 48 órányi inkubáció után a növényeket üvegházi kabinban neveltük tovább, ahol a hőmérséklet nappal 20-22 °C, éjszaka 10-15 °C között változott. A megvilágítás napos idő esetén 19 órától 7 óráig történt, borult idő esetén pedig folyamatosan. A relatív páratartalom 80-90 %-os volt.



a)

b)

c)

**5. ábra.** A rezisztens NIL x fogékony GK Délibáb keresztezéséből származó F<sub>2</sub> populáció fertőzése a) az inokulációhoz szükséges keményítővel dúsított vörösrozsdá szuszpenzió b) a szuszpenzió felhordása ecsettel a csíranövények első levelére, c) a fertőzött növények inkubálása

Az értékelést az inokulációtól számított 10. napon végeztük el az F<sub>2</sub> populáció egyedenkénti jelölésével a fertőzésre adott reakció alapján 0-4 skála (Stakman és mtsai 1962) segítségével (5. táblázat). Az rezisztencia típusok (IT) közül az F<sub>2</sub> populációk jellemzésekor az IT kisebb vagy egyenlő 2 típusokat rezisztensnek, az IT 3 és 4 típusokat fogékonyaként értékeltük.

## 5. táblázat. Levélrozsda rezisztencia típusok osztályozása

Fertőzési típus*	Gazdanövény reakciója	Tünetek
0	immunis	Nincs
;	nagyon rezisztens	Nem sporuláló, hiperszenzitív reakciót mutató foltok
1	rezisztens	Kicsi uredotelepek nekrotikus foltokkal
2	mérsékelten rezisztens	Kicsi, közepes méretű uredotelepek zöld szigettel, azt körülvevő nekrotikus vagy klorotikus foltokkal
3	mérsékelten fogékony	Közepes méretű uredotelepek klorotikus foltokkal vagy a nélkül
4	fogékony	Klorotikus foltok nélküli sporuláló, nagy uredotelepek
-,+	hozzáadása a fertőzési típushoz akkor szükséges, ha a fertőzési típus az adott kategória átlagához képest az uredotelepek nagysága kismértékben eltér	
C	az erősebb klorózist jelzi	
N	az erősebb nekrozízist jelzi	

\*Stakman és mtsai (1962)

### 3.3 DNS izolálás

A fenotípusos vizsgálat elvégzése után az egyedenként jelölt növények második leveléből Rogers and Bendich (1985) általunk módosított CTAB módszerével DNS-t izoláltunk. A búza levelét levélpréssel 2 ml-es Eppendorf csőbe préseltük 700 µl extrakciós CTAB – puffer felhasználásával (100 mM Tris HCl pH 7,5; 1 N NaCl; 15 mM EDTA pH 8,0; 1% CTAB), majd döntögetéssel óvatosan kevertük, és 30 percig 60°C-os vízfürdőben inkubáltuk. Ezután a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten hűtöttük, majd hozzáadtunk fele térfogatnyi kloroform/izoamil-alkoholt (24:1), döntögetéssel kevertük, utána 15 percig centrifugáltuk (6500 rpm). A felülúszót, amely a DNS-t tartalmazta, új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd 1:1 arányú jéghideg (0 °C) izopropanolt adtunk hozzá. Óvatos döntögetéssel felkevertük, és a DNS kicsapódása érdekében a mintákat 10 percre hűtőbe tettük. Majd 10 perces centrifugálás (6500 rpm) következett. A felülúszót leöntöttük, majd a DNS-t jéghideg 1 ml 76 %-os etil-alkohol / 10 mM ammónium-acetát keverékkel mostuk át. A mintákat 5 percig centrifugáltuk (1200 Rpm), majd a felülúszót leöntöttük. Ezután az Eppendorf cső alján visszamaradt DNS-t 70 %-os etil-alkohollal kétszer átmostuk és 5-5 percig centrifugáltuk (12000 rpm). Az etil-alkohol maradéktalan leszívása után a DNS-t légáramban szárítottuk. Ezután a DNS-t 100 µl frissen autoklávozott TE-pufferben (10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0) oldottuk fel. A DNS mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk. A 3.11 alfejezet (Az *Lr20*, *Lr52* és *Lr34* gének azonosítása őszi

búzafajtákban) vizsgálataihoz felhasznált DNS minták izolálása Purnhauser és mtsai (2011 a, b) által alkalmazott módszer alapján történt.

### 3.3.1 Az izolált DNS mennyiségének becslése

Az izolált DNS minőségét és mennyiségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az ismeretlen töménységű DNS mintákat ismert koncentrációjú (5, 10, 50, 100, 150 és 200 ng/μl) hasítatlan λ fág DNS minták standard sorozatával 1,5 %-os agaróz gélen 150 V-on futtattuk, majd etidium-bromidos festés után UV fény használatával tettük láthatóvá. A koncentráció sorhoz viszonyítva becsültük meg a DNS minták töménységét.

### 3.4 RAPD analízis

Polimorf fragmentumok azonosításához összesen 280 RAPD primert (Operon Technologies, USA) teszteltünk rezisztens NIL *Lr52* illetve a fogékony GK Délibáb és Thatcher fajták felhasználásával (8.2 melléklet). A polimorf RAPD primereket a NIL *Lr52*/GK Délibáb F<sub>2</sub> populáció tagjain is teszteltük. A 20 μl végtérfogatú reakcióelegybe az alábbi koncentrációjú komponenseket mértük össze: 2 ng templát DNS, 1x Taq puffer (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 200 μM dNTP mix (Fermentas), 1U Taq DNS polimeráz (Promega) és 0,7 μM RAPD primer. A reakciót PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ-Research) készülékben végeztük az alábbi kondíciókkal: elődenaturálás 94 °C-on 2 percig, majd 40 cikluson keresztül a denaturálás 94 °C-on 30 másodpercig, a primer kapcsolódás 36 °C-on 30 másodpercig, a komplementer szál szintézise 72 °C-on 2 percig, majd a végső szintézis 72 °C-on 10 percig. Az amplifikált fragmentumok elválasztásához 1,5 %-os agaróz gélt használtunk, melyeket a 30 perces 100 V-on való futtatás után etidium-bromidos oldatban festettünk meg, és UV fényben tettünk láthatóvá. A dokumentálást digitális kamerával (Olympus Camedia C2000) végeztük.

### 3.5 AFLP analízis

Az *Lr20* génhez kapcsolt AFLP markerek azonosításához összesen 82 szelektív primerkombináció (8.3 melléklet) vizsgálatát végeztük el a NIL *Lr20*, GK Délibáb és Thatcher fajták bevonásával. A markerjelölteket a NIL *Lr20*/GK Délibáb F<sub>2</sub> populáció tagjain is teszteltük

### 3.5.1 Genomiális DNS minták emésztése és az adapterek ligálása

Az AFLP analízis (Vos és mtsai 1995) során PstI és MseI enzimpárral történt a genomiális DNS emésztése. A reakció megkezdése előtt az izolált DNS mintákat 10 ng/μl koncentrációra hígítottuk. A hígított mintákból 55-55 ng mennyiséget pipettáztunk a PCR csövekbe, majd összeállítottuk a reakció elegyet, mely az alábbi összetevőket tartalmazta 11 μl végtérfogatban: 1x T4 ligáz puffer (Fermentas), NaCl, BSA (Biolabs), 1 U Tru9I (MseI, Fermentas) restriktív enzim, 5 U PstI (Fermentas) restriktív enzim, 0,02 U T4 ligáz (Fermentas), 5,5 μM MseI adapter, 0,55 μM PstI adapter. A mintákat 3 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd 1:20 arányban TE 0,1 pufferrel hígítottuk. A mintákat további felhasználásukig -20 °C-on tároltuk.

### 3.5.2 Preamplifikáció

A preamplifikációhoz templátként a hígított restriktív-ligációs termék 2-2 μl-ét tettük jelölt PCR csövekbe. Egy reakció 20 μl végtérfogatban az alábbi koncentrációjú összetevőket tartalmazta: 1x Taq puffer (Dynazime ext.), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 μM dNTP mix (Fermentas), 600 nM szelektív bázis nélküli PstI primer (5'-GACTGCGTACATGCAG-3'), 600 nM szelektív bázis nélküli MseI primer (5'-GATGAGTCCTGAGTA-3') és 0,3 U Taq polimeráz (Dynazime ext.). A preamplifikációt Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékben végeztük a következő reakciókörülményekkel: 72 °C - 2 perc; 30 ciklus: denaturálás 94 °C - 1 másodperc, primer kapcsolódás 56 °C - 30 másodperc, komplementer szál szintézise 72 °C - 2 perc; végül 60 °C - 30 perc. A preamplifikált terméket TE 0.1 pufferrel 1:10 arányban hígítottuk.

### 3.5.3 Főamplifikáció

A hígított preamplifikált mintákból 5-5 μl-t PCR csövekbe tettünk. A főamplifikációhoz szükséges reakcióelegyet az alábbiak szerint állítottuk össze 20 μl végtérfogatban: 1x Taq puffer (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 200 μM dNTP mix (Fermentas), 900 nM szelektív PstI primer, 750 nM szelektív MseI primer, 1U Taq polimeráz (Promega). A főamplifikációt az alábbi reakciókörülmények között végeztük Perkin-Elmer GeneAmp 9700 készülékben: elődenaturálás 95 °C - 2 perc; 9 ciklus: denaturálás 94 °C - 1 másodperc, primer kapcsolódás 65 °C-ról a 9. ciklus végére 56 °C - 30 másodperc, komplementer szál szintézise 72 °C - 2 perc; 22 ciklus: denaturálás 94 °C - 1 másodperc, primer kapcsolódás 56 °C - 30 másodperc, komplementer szál szintézise 72 °C - 2 perc; végül 60 °C - 30 perc. A szelektív amplifikációs



termékeket 5 %-os denaturáló poliakrilamid gélen 70 W-on választottuk el 1x TBE pufferben, majd ezüstoffestéssel tettük láthatóvá (Promega Protocol Q4132).

### 3.6 RGAP analízis

Az RGAP analízist kis módosításokkal Chen és mtsai (1998) leírása alapján végeztük el a NIL *Lr20*, GK Délibáb és Thatcher fajták valamint a NIL *Lr20*/GK Délibáb F<sub>2</sub> populáció tagjain. A primerek szekvenciáját Dr Xianming Chen (USDA, USA) bocsátotta rendelkezésünkre (8.4 melléklet). A reakcióelegy 20 µl végtérfogatban az alábbi összetevőket tartalmazta: 10 ng DNS, 1x PCR puffer (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 200 µM dNTP mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,25-0,25 µM mindkét primer valamint 1U Taq DNS polimeráz (Promega). A reakciót PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) készülékben végeztük az alábbi kondíciókkal: elődenaturálás 94 °C-on 8 percig, majd 40 cikluson keresztül a denaturálás 94 °C-on 1 percig, a primer kapcsolódás 45 °C-on 1 percig, a komplementer szál szintézise 72 °C-on 2 percig, majd a végső szintézis 72 °C-on 10 percig. Az így amplifikált fragmentumokat 5%-os denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el 90 W-on 1x TBE pufferben, majd ezüstoffestéssel tettük láthatóvá a Promega Q4132 Protocol szerint.

### 3.7 STS analízis

Az *Lr20* rezisztencia gén esetében a Neu és mtsai (2002) által azonosított *Xsts638* marker kapcsoltságát vizsgáltuk meg az általunk előállított szegregáló populációban. Az *Lr52* rezisztencia gén esetében a Grain Genes, búza adatbázisban (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) az 5BS kromoszómára 8 kromoszómaspecifikus STS primerszekvenciát találtunk, valamint az Obert és mtsai (2005) által leírt txw200 primert használtuk a rezisztencia génhez kapcsolt STS markerek azonosítására. A PCR reakció kondíciói megegyeztek az SSR (3.8 fejezet) módszernél leírtakkal. A detektálást 1,5 %-os agaróz gélen végeztük el a RAPD reakciónál (3.4 fejezet) leírt módon.

### 3.8 SSR analízis

Az *Lr20* génhez kapcsolt SSR markerek azonosításához 48, a búza 7A kromoszómájának hosszú karjára térképezett, mikroszatellit primert teszteltünk (8.5 melléklet) a NIL *Lr20*, GK Délibáb és Thatcher fajták valamint a NIL

*Lr20*/GK Délibáb F<sub>2</sub> populáció tagjain. Az *Lr52* rezisztencia génhez kapcsolt SSR markerek azonosításához a búza 5B kromoszómájának rövid karjára térképezett 44 mikroszatellit primert vizsgáltunk (8.6 melléklet) a NIL *Lr52*, GK Délibáb és Thatcher fajták valamint a NIL *Lr52*/GK Délibáb F<sub>2</sub> populáció tagjain. A primerek szekvenciáját a Grain Genes, búza adatbázisból kerestük ki (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>). A kísérleteinkben alkalmazott SSR markereket korábban Röder és mtsai (1998), Gupta és mtsai (2002), Song és mtsai (2005), Guyomarc'h és mtsai (2002) és Somers és mtsai (2004) térképezték. Mindkét rezisztencia gén esetében minden PCR reakció az alábbi összetevőket tartalmazta 20 µl végtérfogatban: 10 ng DNS, 1x PCR puffer (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 200-200 µM dNTP (Fermantas), 0,25-0,25 µM mindkét primer, valamint 0,5 U Taq DNS polimeráz (Promega). A reakciót PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ-Research) készülékben végeztük az alábbi kondíciókkal: elődenaturálás 94 °C-on 8 percig, majd 40 cikluson keresztül a denaturálás 94 °C-on 5 másodpercig, a primer kapcsolódás 50, 55 vagy 60 °C-on (a primer kapcsolódási hőmérsékletének megfelelően, 8.5 és 8.6 melléklet) 5 másodpercig, a komplementer szál szintézise 72 °C-on 8 másodpercig, majd a végső szintézis 72 °C-on 5 percig. Az egyes SSR primerek által amplifikált fragmentumokat 5%-os denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el 90 W-on 1x TBE pufferben, majd ezüstfestéssel tettük láthatóvá (Promega Protocol Q4132).

### 3.9 Statisztikai számítások

#### 3.9.1 Chi<sup>2</sup> analízis

A Chi<sup>2</sup> analízist az alábbi összefüggés alapján számoltuk ki:

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{megfigyelt} - \text{várt hasadási arány})^2}{\text{Várt hasadási arány}}$$

Az általunk kapott  $\chi^2$  értéket ezután összevetettük az 1-es szabadságfokhoz tartozó  $\chi^2$  értékkel P=0,05 valószínűségnél (Sváb 1981).

#### 3.9.2 Genetikai térképezés

A molekuláris markerek kapcsoltsági analízisét és genetikai térképezését az *Lr20* és az *Lr52* rezisztencia gén esetében is a MAPMAKER 3.0 számítógépes programmal végeztük el (Lander és mtsai 1987). A kapcsoltság mértékének kiszámításához a Kosambi térképezési függvényt alkalmaztuk (Kosambi 1944).

### 3.9.3 Student-próba

Az *Lr34* gén hatékonyságát a markert hordozó és nem hordozó fajták fertőzöttségi százalékának évenkénti átlaga szerint t-próbával igazoltuk (Sváb 1981).

### 3.10 Markerre alapozott szelekció tesztelése

A markerre alapozott szelekcióhoz donorként az *Lr20* gént hordozó Thatcher\*6/Timmo közel izogén vonalat kereszteztük négy, Magyarországon elismert őszi búza fajtával (GK Békés, GK Élet, GK Garaboly, Jubilejnaja-50) és egy nemesítési vonallal (VR95B343). Az  $F_2$  növényekben az *Lr20* gén jelenlétét az STS638 (Neu és mtsai 2002) domináns marker segítségével ellenőriztük. A markert hordozó utódokkal visszakeresztezési programot indítottunk a Jubilejnaja-50 fajta bevonásával. A rezisztencia gén jelenlétét szintén az *Xsts638* markerrel ellenőriztük minden utódpopulációban a 3.7 fejezetben leírt módszer alapján.

### 3.11 Az *Lr20*, *Lr52* és *Lr34* gének azonosítása őszi búzafajtákban

Az *Lr20*, *Lr52* és *Lr34* rezisztencia gén jelenlétét 1970-2004 között Magyarországon államilag elismert 222 őszi búzafajtából izolált DNS mintákból vizsgáltuk molekuláris markerek segítségével - a búzafajták DNS mintáit (Purnhauser és mtsai 2011a) Dr. Purnhauser László bocsátotta rendelkezésemre. A fajták között továbbá szerepelt egy, a hazánkban 1960-ban elismert orosz fajta is, a Bezosztaja 1, amely hosszú ideig meghatározó szerepet töltött be a hazai búzatermelésben és a nemesítési programokban egyaránt. A fajták neve, eredete, a regisztráció és visszavonás éve a 10. táblázatban található.

Az *Lr20* gént az *Xsts638* nevű STS (Neu és mtsai 2002) és az általunk azonosított *Xgwm344*, *Xwmc809* és *Xwmc274* SSR markerekkel, az *Lr52* rezisztencia gént a kodomináns öröklődésű *Xgwm234* SSR markerrel, valamint az *Lr34*-et az *XcsLV34* (Lagudah és mtsai 2006) STS markerrel azonosítottuk. Az *Lr52* és *Lr20* rezisztencia gének azonosítása az STS markerek esetén a 3.7. fejezetben, az SSR markerek esetén a 3.8. fejezetben leírt módon történt.

Az *XcsLV34* marker azonosításához a PCR reakcióelegyet az SSR analízisnél (3.8 fejezet) a fargmentumok detektálását a 3.4 fejezetben ismertetett módszer alapján végeztük el. A PCR reakciót PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ-Research) készülékben végeztük az alábbi kondíciókkal: elődenaturálás 94 °C-on 5 percig, majd 40 cikluson keresztül a denaturálás 94

°C-on 30 másodpercig, a primer kapcsolódás 55 °C-on 30 másodpercig, a komplementer szál szintézise 72 °C-on 30 másodpercig, majd a végső szintézis 72 °C-on 4 percig.

A fajták levélrozsda rezisztencia adatait a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (MgSzH) évente megjelenő kiadványaiból gyűjtöttük. A megfigyeléseket Dr. Békési Pál és Hertelendy Péter végezte Röjtökmuzsajon és Debrecenben természetes levélrozsda fertőzés alapján. A tünetek értékelése a leveleken látható fertőzési százalék alapján történt. Az *Lr34* gént hordozó és nem hordozó fajták rezisztencia adatainak elemzését az évenkénti átlaghoz viszonyítva t-próbával végeztük (Sváb 1981).

## 4. EREDMÉNYEK

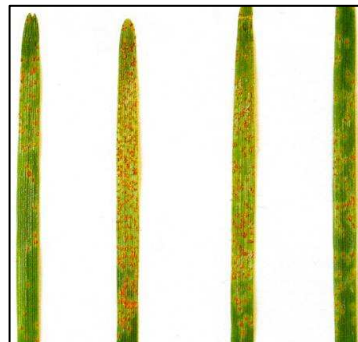
### 4.1 Az *Lr20* génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása és jellemzése

#### 4.1.1 Fenotipizálás

A molekuláris markerek valamint az *Lr20* gén kapcsoltságának vizsgálatához a rezisztens NIL *Lr20* valamint a fogékony GK Délibáb szülőket és a keresztezésükből létrejött F<sub>2</sub> populáció 119 egyedét az *Lr20* génre avirulens levélrozsda monospórák izolátummal fertőztük. A fertőzés után tíz nappal a NIL *Lr20* rezisztens szülőn és az F<sub>2</sub> populáció rezisztens egyedeinek levélszínén az *Lr20* rezisztencia génre jellemző hosszanti nekrotikus foltokat figyeltünk meg sporuláló telepek nélkül vagy túszerű, esetleg közepes méretű sporuláló telepekkel (6A és C ábra). A GK Délibáb fogékony szülőn valamint az F<sub>2</sub> populáció fogékony egyedein jól megfigyelhetőek voltak a rozsdavörös uredospórákat tartalmazó uredotelepek (6B és C ábra). A populáció direkt fertőzésre adott eredményeinek értékelése után a 119 egyedből 73 volt rezisztens és 46 volt fogékony. A  $\chi^2$  érték számítása után megállapítottuk, hogy populációnkban a várt 3:1 hasadási arány nem igazolt. Az általunk vizsgált populációban 2:1 hasadási arányt igazoltunk ( $\chi^2=1,27$ ;  $df=1$   $P=0,25$ ) (6. táblázat).



A



B



C

**6. ábra.** A NIL *Lr20* rezisztens és a GK Délibáb fogékony fajta keresztezéséből létrejött F<sub>2</sub> populáció fenotípusos vizsgálata (C), valamint az *Lr20* génre jellemző nekrotikus foltok (A) és a GK Délibábban megjelenő sporuláló telepek (B).

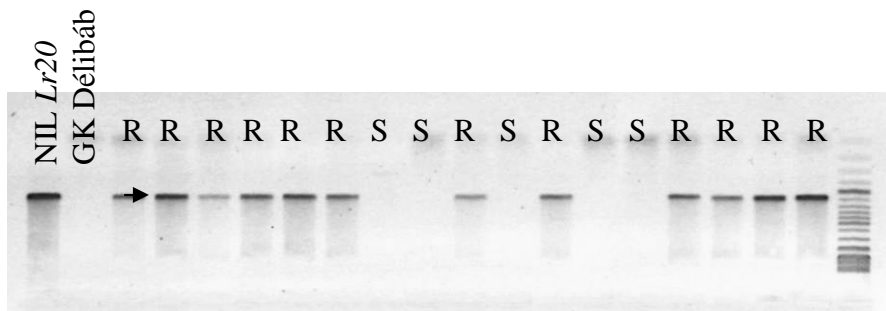
**6. táblázat.** A NIL *Lr20* rezisztens és GK Délibáb fogékony szülő keresztezéséből létrejött F<sub>2</sub> fenotípusos vizsgálati eredményeinek összefoglalása

	F <sub>2</sub> populáció eredményei*			szegregáció	$\chi^2$
	RR, Rr	rr	összesen		
Várt	73	46	119	3:1	11,12
Tapasztalt	73	46	119	2:1	1,27

\* RR és Rr jelöli a rezisztens, rr a fogékony fenotípusú egyedeket.

#### 4.1.2 *Xsts638* marker jellemzése a NIL *Lr20*/GK Délibáb F<sub>2</sub> populációban

Neu és mtsai (2002) által leírt, az *Lr20* rezisztencia génre specifikus STS markert (*Xsts638*) sikeresen alkalmaztuk az általunk előállított F<sub>2</sub> populáció jellemzésére. A primer 542 bp hosszú, jól azonosítható polimorf fragmentumot amplifikált a rezisztens egyedekben (7. ábra). A marker és az *Lr20* rezisztencia gén közötti kapcsoltságot igazoltuk és az *Xsts638* markert 4,6 cM távolságra térképeztük a rezisztencia gén proximális oldalára (11. ábra).



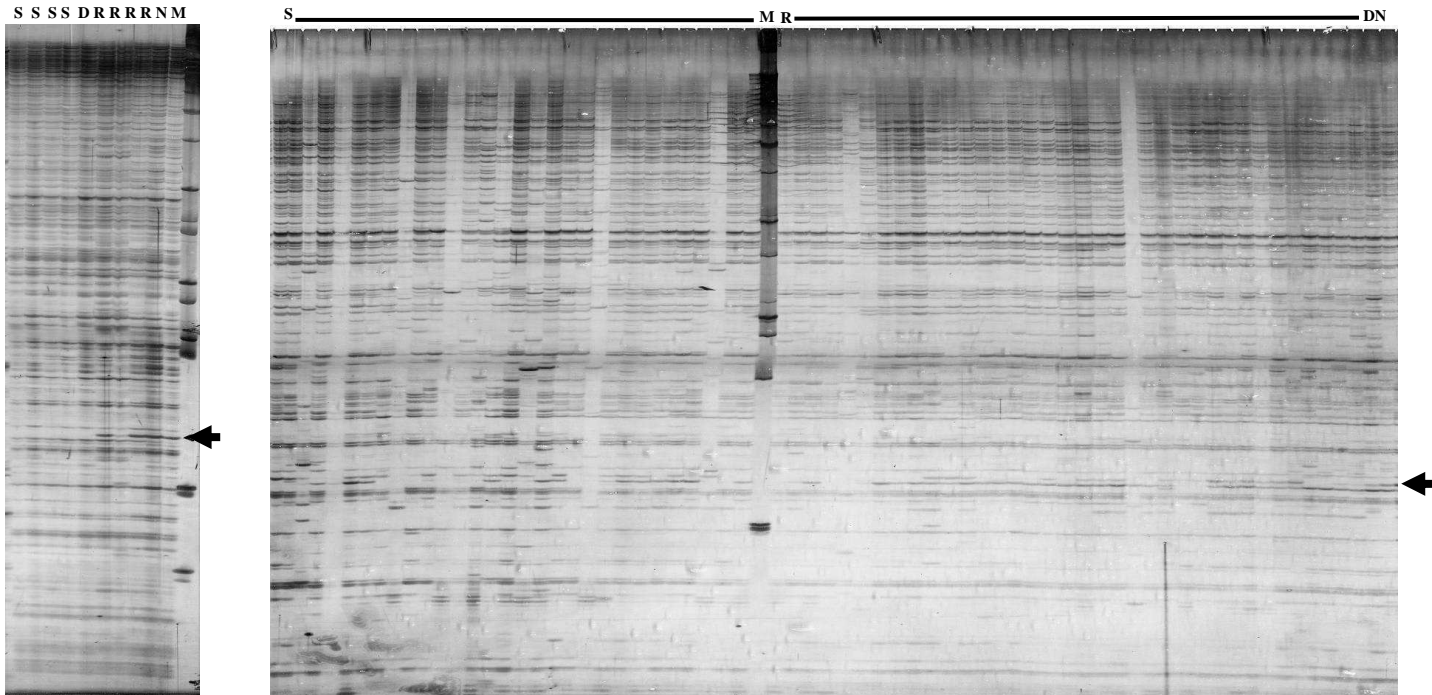
**7. ábra.** Az sts638 primer által amplifikált 542 bp hosszú polimorf fragmentum szegregációja a NIL *Lr20* és GK Délibáb keresztezéséből létrejött F<sub>2</sub> populációban

#### 4.1.3 Az *Lr20* génhez kapcsolt AFLP markerek azonosítása

Összesen 82 db PstI/MseI primerkombináció vizsgálatát végeztük el az *Lr20* rezisztencia génhez szorosan kapcsolt molekuláris marker azonosítása céljából. A NIL *Lr20* és a Thatcher fajta közötti AFLP primerekkel történő tesztelése során túl sok polimorf fragmentumot azonosítottunk. A markerjelöltek számának csökkentése érdekében a szülők mellett a keresztezésükből származó F<sub>2</sub> populáció 4 rezisztens és 4 fogékony egyedét is bevontuk a primerek tesztelésébe. Ennek eredményeképpen csak azokat a primereket vizsgáltuk tovább, amelyek által amplifikált polimorf fragmentum megjelent a rezisztens F<sub>2</sub> egyedekben is. Így 7 primerpár 11 polimorf fragmentumot amplifikált (7. táblázat). A teljes populáció kapcsoltsági vizsgálata előtt 30 rezisztens és 30 fogékony F<sub>2</sub> egyeddel előkísérletet végeztünk (8. ábra). Megállapítottuk, hogy a 11 markerjelölt közül egy sem kapcsolt a rezisztencia génhez.

**7. táblázat:** NIL*Lr20* és Thatcher között azonosított polimorf fragmentumok mérete és az AFLP primerpárok neve

PstI primer	MseI primer	Polimorf fragmentum mérete
P-ACA	M-CAC	100-200 bp között
P-ACT	M-CAC	400 bp 400-500 bp között 600-700 bp között
P-ACT	M-CAG	500-600 bp között
P-ACT	M-CTG	200-300 bp között 300-400 bp között
P-ACA	M-CTC	300-400 bp között
P-AGC	M-CTG	300-400 bp között
P-AGG	M-CTG	100-200 bp között
P-ACC	M-CTA	500-600 bp között

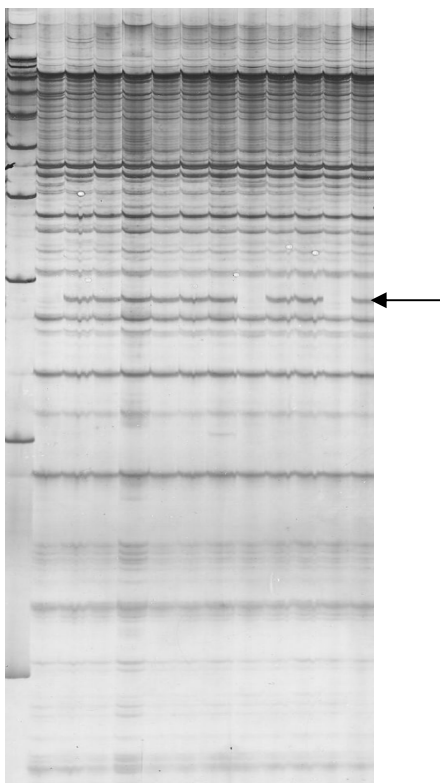


**A** **8. ábra.** P-AGG és M-CTG primerkombináció által amplifikált polimorf fragmentum (A) és az F<sub>2</sub> populációval végzett kapcsoltsági analízis (B) Az (A) és (B) ábrán is nyíllal jelöltük a kb. 100-200 bp hosszú polimorf fragmentumot. N: NIL *Lr20*; D: GK Délibáb; R: rezisztens F<sub>2</sub> egyedek; S: fogékony F<sub>2</sub> egyedek; M: molekulásúly marker



#### 4.1.4 Az *Lr20* génhez kapcsolt RGAP markerek azonosítása

A NIL *Lr20* és GK Délibáb szülőket, valamint a Thatcher fajtát 48 db RGAP primerkombinációval teszteltük polimorf fragmentumok azonosítása céljából. Mindössze egy primerkombináció („Ptokin1/NLRR for”) mutatott polimorfizmust a NIL *Lr20* és Thatcher között. Ez a primerkombináció egy kb. 390 bp hosszú polimorf fragmentumot (RGAP<sub>390</sub>) amplifikált a NIL *Lr20* rezisztens szülőben. A kapcsoltsági analízist a NIL *Lr20*/GK Délibáb keresztezéséből létrehozott F<sub>2</sub> populáció 119 egyedének bevonásával végeztük el (9. ábra). Az adatok elemzése után a 119 egyedből 96-nál detektáltuk a polimorf fragmentumot és 23-nál nem. Megállapítottuk, hogy ez a marker nem kapcsolt az *Lr20* génhez.



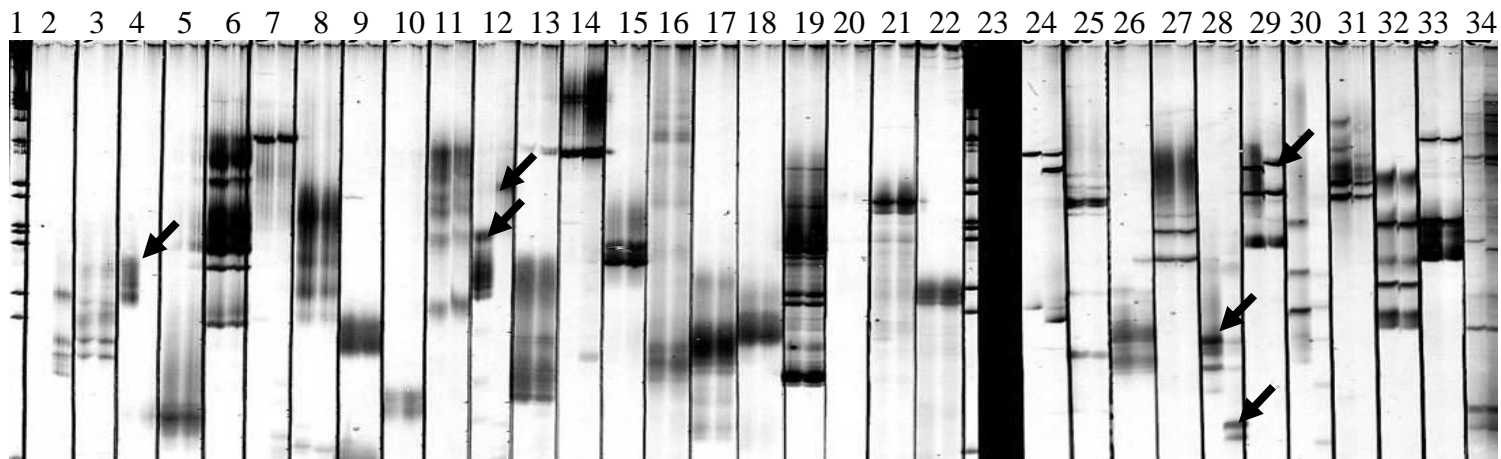
**9. ábra.** „Ptokin1/NLRR for” primerkombináció által azonosított 390 bp hosszú polimorf fragmentum szegregációja az F<sub>2</sub> populációban (a nyíl a polimorf fragmentumot jelöli).

#### 4.1.5 Az *Lr20* génhez kapcsolt SSR markerek azonosítása és jellemzése

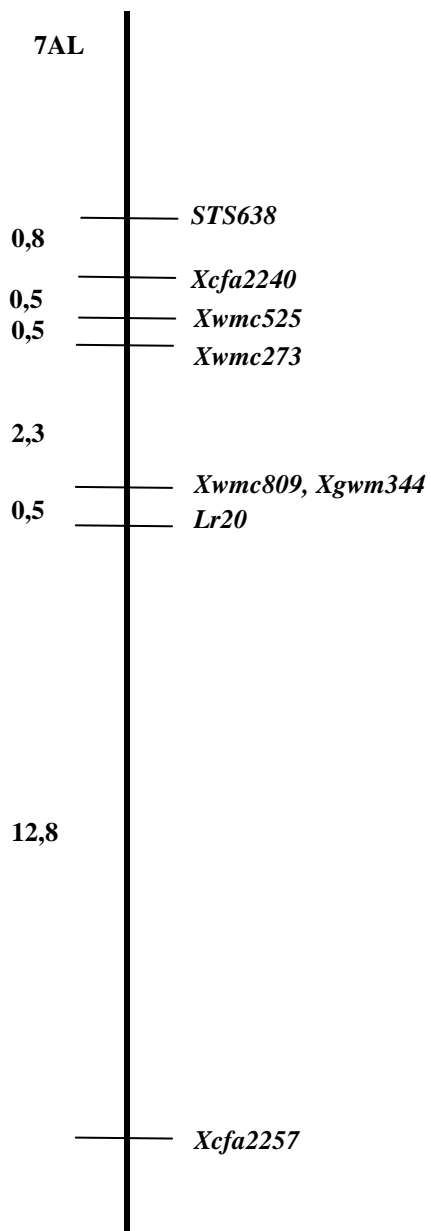
Az *Lr20* génhez szorosan kapcsolt kodomináns markerek azonosítása céljából a Grain Genes adatbázisban szereplő, a 7A kromoszóma hosszú karjára térképezett 48 db SSR markert is bevontuk vizsgálatainkba. A NIL *Lr20* és a Thatcher között 6 primer (*cfa2240*, *cfa2257*, *gwm344*, *wmc273*, *wmc525* és *wmc809*) amplifikált polimorf fragmentumot (10. ábra). A polimorf fragmentumok méretét 100-310 bp közé határoztuk meg (8. táblázat). Az *Xwmc809* és *Xgwm344* markerek repulzív fázisban vannak jelen, tehát a polimorf fragmentum csak a fogékony egyedekben és a heterozigóta egyedekben azonosítható. A kapcsoltsági analízis igazolta, hogy a hat SSR marker mindegyike kapcsolt az *Lr20* génhez. A markerek és a rezisztencia gén közötti térképtávolságot 0,5-12,8 cM között határoztuk meg. A rezisztencia gén proximális oldalára öt SSR marker térképeződött, amelyek sorrendben a következők: *Xwmc809* (0,5 cM), *Xgwm344* (0,5 cM), *Xwmc273* (2,8 cM), *Xwmc525* (3,3 cM), *Xcfa2240* (3,8 cM). A rezisztencia gén disztális oldalára egyetlen SSR marker, az *Xcfa2257* (12,8 cM) térképeződött (11. ábra).

**8. táblázat:** Polimorf SSR primerek és az általuk amplifikált fragmentumok mérete a NIL *Lr20* és a GK Délibáb vizsgálata során

SSR neve	polimorf fragmentum mérete	
	NIL <i>Lr20</i>	GK Délibáb
<i>cfa2240</i>	310 bp	300 bp
<i>cfa2257</i>	100 bp	130 bp
<i>gwm344</i>	-	145 bp
<i>wmc273</i>	200 bp	180 bp
<i>wmc525</i>	264 bp	210 bp
<i>wmc809</i>	-	155 bp



**10. ábra.** A 7AL kromoszómára specifikus SSR primerek tesztelése. A nyilak a polimorf fragmentumokat jelölik. 1. és 23 a molekulásúly markert, 2-22 és 24-34 a tesztelt SSR primereket jelöli (rendre: wmc9, wmc83, wmc809, wmc790, wmc695, wmc65, wmc633, wmc607, wmc603, wmc596, wmc525, wmc488, wmc422, wmc17, wmc139, gwm554, gwm10, cfd193, cfa2019, barc195, barc108, cfd20, gwm4, wmc182, barc70, cfa2257, cfa2240, cfa2174, cfa2040, barc121, barc49, barc29)

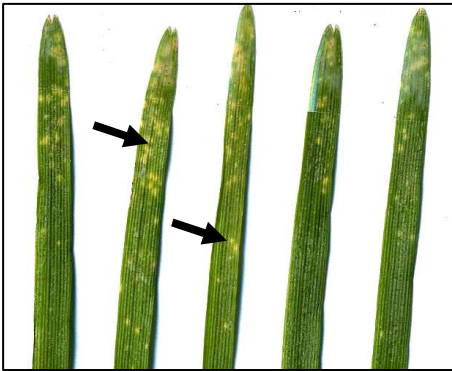


**11. ábra.** Az *Lr20* génhez kapcsolt SSR és STS markerek genetikai térképe. Jobb oldalon a markerek neve, baloldalon a genetikai távolság cM-ban olvasható.

## 4.2 Az *Lr52* génhez kapcsolt molekuláris markerek azonosítása és jellemzése

### 4.2.1 Fenotipizálás

A polimorf fragmentumok, valamint az *Lr52* rezisztencia gén kapcsoltságának megállapításához a NIL *Lr52* rezisztens és GK Délibáb fogékony szülő keresztezéséből származó F<sub>2</sub> populációt (267 egyed) állítottunk elő. A szülőket és az F<sub>2</sub> populáció egyedeit az NIL *Lr52* vonalra avirulens, de a GK Délibáb fajtára virulens izolátummal fertőztük. A fertőzés után 10 nappal a NIL *Lr52* rezisztens szülőn és az F<sub>2</sub> populáció rezisztens egyedein az *Lr52* rezisztencia génre jellemző klorotikus tüneteket figyeltünk meg (12A és 13. ábra). A rezisztens szülő fenotípusát a Stakman skála szerinti első (;), az F<sub>2</sub> populáció rezisztens egyedeit pedig az első három infekciós típusba (; ill. 1 és 2 típusok) soroltuk. A fogékony szülőn jól megfigyelhetőek voltak az uredospórákat tartalmazó nagy sporuláló telepek, amelyeket klorotikus folt nem vett körül (Stakman skála szerinti 4-es infekciós típus) (12B ábra). Az F<sub>2</sub> populáció szenzitív egyedein nagy, uredospórákat tartalmazó sporuláló telepeket figyeltünk meg. Ha az említett sporuláló telepet klorózis vette körül, akkor a Stakman skála szerint 3, ha nem akkor 4 infekciós csoportba soroltuk. A populáció értékelése után 188 növény volt rezisztens és 79 volt fogékony. Chi<sup>2</sup> teszt elvégzése után (Chi<sup>2</sup>=2,87; P=0,05) megállapítottuk, hogy populációnkban az *Lr52* gén domináns öröklődést mutat (3:1 hasadási arány).



A



B

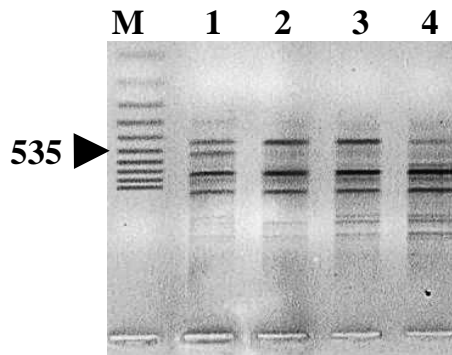
**12. ábra.** A NIL *Lr52* rezisztens szülőn megfigyelt, az *Lr52* génre jellemző klorotikus foltok (ábrán fekete nyilakkal jelzett) sporuláló telepek nélkül (A), valamint a GK Délibáb fogékony szülő levelein látható sporuláló uredotelepek (az ábrán fekete nyilakkal jelzett) klorózis nélkül (B) a fenotipusos vizsgálat során



**13. ábra.** A NIL *Lr52* és GK Délibáb keresztezéséből létrejött F<sub>2</sub> populáció fenotipizálása

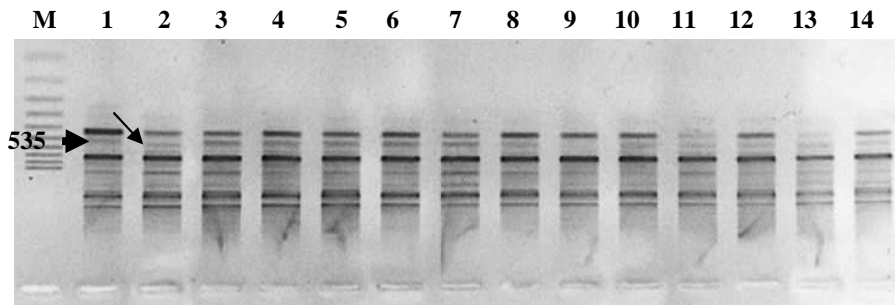
#### 4.2.2 Az *Lr52* génhez kapcsolt RAPD marker azonosítása

Összesen 280 RAPD primerrel (8.2 melléklet) teszteltük a rezisztens NIL *Lr52* és a szenzitív GK Délibáb és Thatcher fajtákat polimorfizmus azonosítás céljából. A 280 primerből 23 (OPN15, OPN17, OPO8, OPO14, OPO17, OPP10, OPP12, OPP13, OPP18, OPP20, OPR18, OPR19, OPS2, OPS4, OPS6, OPS10, OPS14, OPS15, OPS20, OPT3, OPT9, OPT10, OPT11) nem amplifikált értékelhető fragmentumokat. A fennmaradó 177 RAPD primer 3-7 fragmentumot amplifikált 200 és 2500 bp között. A vizsgált primerek közül 11 (OPR10, OPR11, OPR16, OPV2, OPV4, OPV14, OPW19, OPX9, OPX12, OPY4, OPY9) amplifikált jól ismételt polimorf fragmentumot a NIL *Lr52* valamint a GK Délibáb között, azonban a rezisztencia gént tartalmazó közel izogén vonal és a Thatcher között mindössze egy primerrel (OPR10) sikerült azonosítani egy jól ismételt, 535 bp hosszú polimorf fragmentumot (*Xopr10*) (14. ábra). A kapcsoltsági vizsgálatot ez utóbbi markerjelölttel végeztük el az F<sub>2</sub> populáció 267 egyedén. Munkánkat nehezítette, hogy a GK Délibáb szülőben is megfigyeltünk egy polimorf fragmentumot, amelynek mérete néhány bázispárral volt csak nagyobb, mint a rezisztens szülőben azonosított fragmentum. Az F<sub>2</sub> populáción végzett kapcsoltsági analízis során a két alig eltérő méretű fragmentum megkülönböztetésére az agaróz gélelektroforézisnél jóval hosszabb futtatási időt alkalmaztunk. A 267 F<sub>2</sub> egyed kapcsoltsági analízisének (15. ábra) elvégzése után megállapítottuk, hogy az *Xopr10* marker 18,2 cM távolságra a rezisztencia gén proximális oldalán található, és a GK Délibában azonosított fragmentum nem kapcsolt a rezisztenciához (24. ábra).



**14. ábra.** Az *Xopr10* marker azonosítása a NIL *Lr52* rezisztens vonalban 1: NIL *Lr52*; 2: NIL *Lr20*; 3: Thatcher; 4: GK Délibáb; M: molekulásúly marker. A nyíl a polimorf fragmentumot jelöli

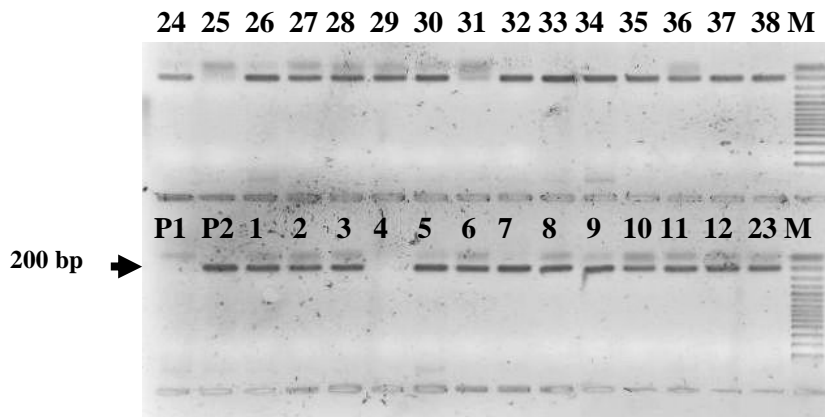




**15. ábra.** Az *Xopr10* marker szegregációja a NIL *Lr52* és GK Délibáb keresztezéséből létrehozott F<sub>2</sub> populációban. 1: NIL *Lr52*; 2: GK Délibáb; 3-8 és 10, 14: rezisztens F<sub>2</sub> egyedek; 9 és 11-13: fogékony F<sub>2</sub> egyedek. Az egyenes nyíl az *Lr20* rezisztencia génhez kapcsolt markert, a ferde nyíl (2. minta) a GK Délibábban azonosított polimorf fragmentumot jelöli

#### 4.2.3 Az *Lr52* génhez kapcsolt STS marker azonosítása

A Grain Genes adatbázisban 8 db, az 5BS kromoszómára specifikus STS markert találtunk. E primerek egy kivételével (txw200) monomorf mintázatot adtak a NIL *Lr52* és a Thatcher között. Az Obert és mtsai (2005) által leírt txw200 azonban polimorf fragmentumot amplifikált a rezisztens és a fogékony szülő között. Ezt a 200 bp hosszú markert alkalmaztuk az F<sub>2</sub> szegregálódó populáció egyedeinek jellemzésére (16. ábra). A genetikai távolságot 3,6 cM-ban állapítottuk meg és a markert az *Lr52* rezisztencia gén disztális oldalára térképeztük (24. ábra).

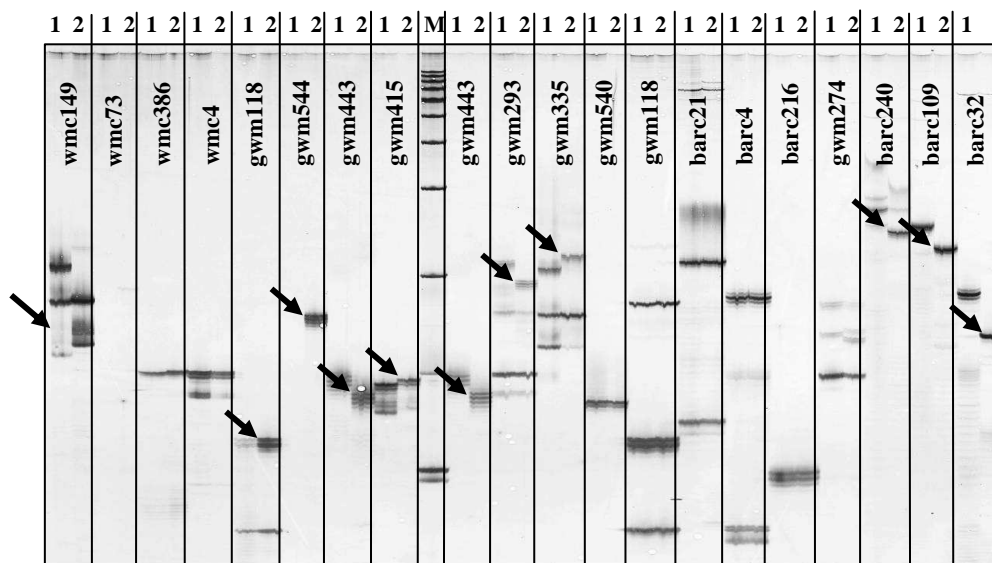


**16. ábra.** Az *Xtxw200* marker szegregációja az általunk létrehozott NIL *Lr52*/GK Délibáb  $F_2$  populációban. P1: GK Délibáb (fogékony szülő); P2: NIL *Lr52* (rezisztens szülő); 1-3; 5-23; 26-30; 32-38: rezisztens  $F_2$  egyedek; 4, 25, 31: fogékony  $F_2$  egyedek; 24: rekombináns  $F_2$  egyed

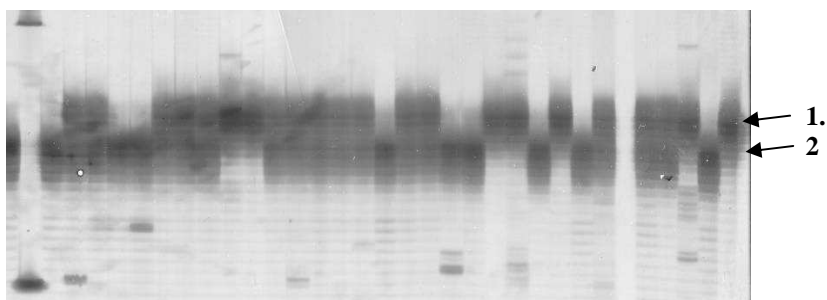
#### 4.2.4 Az *Lr52* génhez kapcsolt SSR markerek azonosítása

A Grain Genes adatbázisban 44 db, az 5B kromoszóma rövid karjára specifikus SSR primerpárt találtunk (8.6 melléklet). A primereket a rezisztens és fogékony szülő, valamint a Thatcher közötti polimorfizmus azonosítására használtuk fel (17. ábra). A két szülő között összesen 19 (barc109, barc240, barc32, cfa2121, cfd5, cfd20, gwm68, gwm133, gwm191, gwm213, gwm234, gwm293, gwm335, gwm415, gwm443, wmc149, wmc630, wmc728, wmc773) a rezisztens szülő és a Thatcher között azonban mindössze 6 (cfd20, gwm133, gwm234, gwm443, wmc149, wmc630) SSR primer amplifikált polimorf fragmentumot. A kapcsoltsági analízist azokkal a markerjelöltekkel végeztük el, amelyek a rezisztens szülő és a Thatcher között polimorfizmust mutattak (18-23. ábrák). A hat SSR marker midegyike kapcsoltságot mutatott az *Lr52* rezisztencia génhez. Az SSR markerek 7,2 - 46,5 cM távolságra térképeződtek. A rezisztencia gén disztális oldalán a legközelebbi marker 7,2 cM (*Xgwm234*), a proximális oldalán 11,3 cM (*Xwmc149*) távolságra helyezkedik el (24. ábra). A markerek 1:2:1 szegregációja a  $\chi^2$  teszt szerint igazolt, szegregációs torzulást egy esetben sem figyeltünk meg (9. táblázat). Mivel az általunk azonosított SSR markerek kodominánsak,

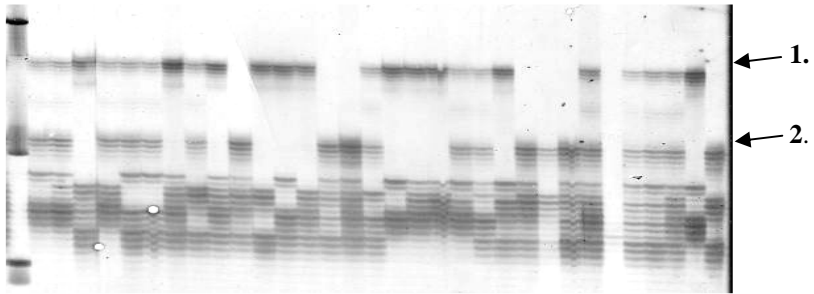
ezért mind a homozigóta mind a heterozigóta egyedek elkülönítésére alkalmasak.



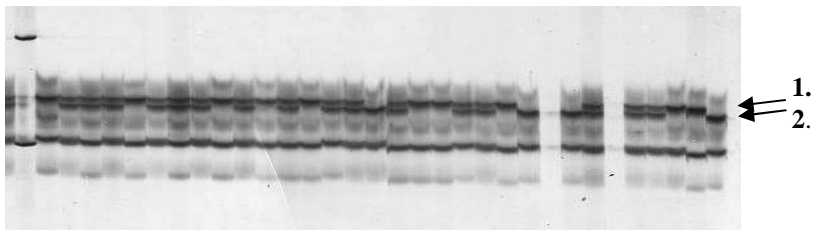
17. ábra. 5BS kromoszómára térképezett SSR primerek tesztje. 1: GK Délibáb 2: NIL *Lr52* Polimorf fragmentumokat nyíllal jelöltük



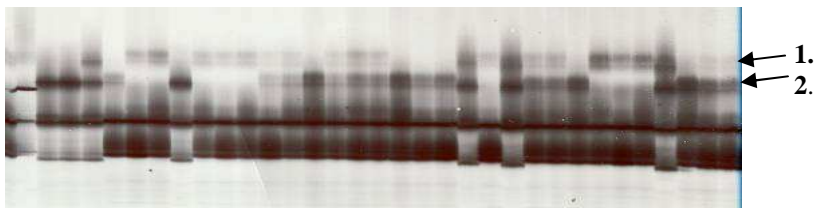
18. ábra. Az *Xgwm443* szegregációja. Az 1. nyíl a fogékony GK Délibábnban, a 2. nyíl a rezisztens NIL *Lr52*-ben amplifikálódott fragmentumokat jelöli



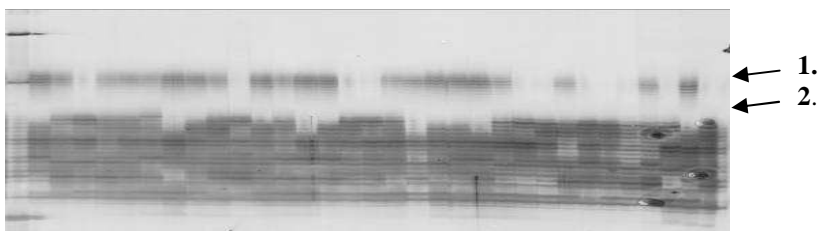
**19. ábra.** Az *Xgwm133* szegregációja. Az 1. nyíl a NIL *Lr52*-ben, a 2. nyíl a GK Délibábban azonosított fragmentumot jelöli.



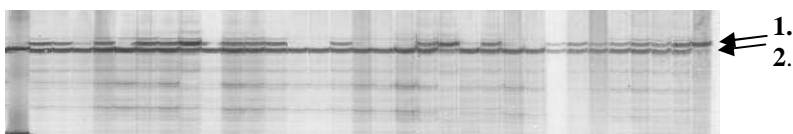
**20. ábra.** Az *Xgwm234* szegregációja. Az 1. nyíl a NIL *Lr52*-ben, a 2. nyíl a GK Délibábban azonosított fragmentumot jelöli.



**21. ábra.** Az *Xwmc149* szegregációja. Az 1. nyíl a NIL *Lr52*-ben, a 2. nyíl a GK Délibábban azonosított fragmentumot jelöli.



**22. ábra.** Az *Xwmc630* szegregációja. Az 1. nyíl a NIL *Lr52*-ben, a 2. nyíl a GK Délibábnban azonosított fragmentumot jelöli.

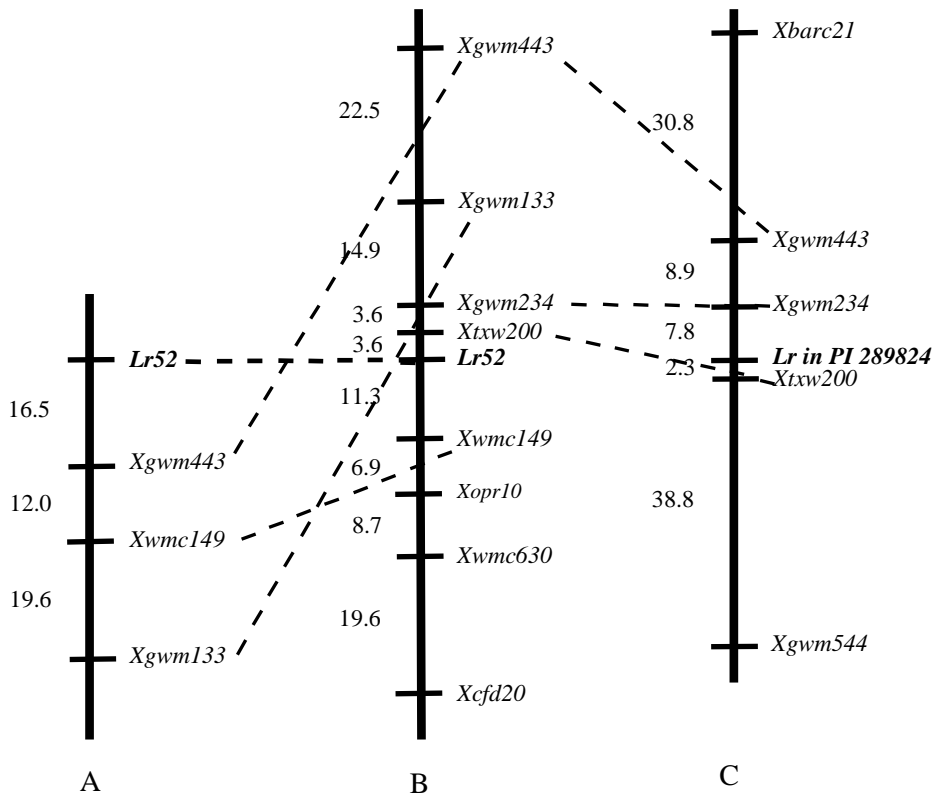


**23. ábra.** Az *Xcfd20* szegregációja. Az 1. nyíl a GK Délibábnban, a 2. nyíl a NIL *Lr52*-ben azonosított fragmentumot jelöli.

**9. táblázat.** Az SSR markerek szegregációja a NIL *Lr52* és GK Délibábn keresztezésből létrehozott  $F_2$  populációban

Gén/markert	Megfigyelt <sup>a</sup>			Vizsgált $F_2$ egyedek száma	Várt szegregáció	$\chi^2$
	$P_1P_1$	$P_1P_2$	$P_2P_2$			
<i>Lr52</i>	188		79	267	3:1	2,87
<i>Xgwm234</i>	67	140	60	267	1:2:1	1,10
<i>Xwmc149</i>	63	145	59	267	1:2:1	2,19
<i>Xcfd20</i>	56	148	63	267	1:2:1	3,63
<i>Xgwm443</i>	62	147	58	267	1:2:1	2,85
<i>Xgwm133</i>	68	132	67	267	1:2:1	0,06
<i>Xwmc630</i>	55	150	62	267	1:2:1	4,32

<sup>a</sup>  $P_1P_1$  jelenti a homozigóta és  $P_1P_2$  a heterozigóta rezisztens egyedekben azonosított SSR allélt és  $P_2P_2$  a fogékony szülői allélokot



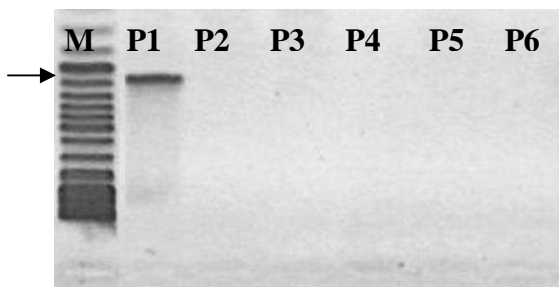
Hiebert és mtsai 2005      Tar és mtsai 2008      Obert és mtsai 2005

**24. ábra.** Az *Lr52* rezisztencia génhez kapcsolt molekuláris markerek az 5B kromoszóma rövid karján.

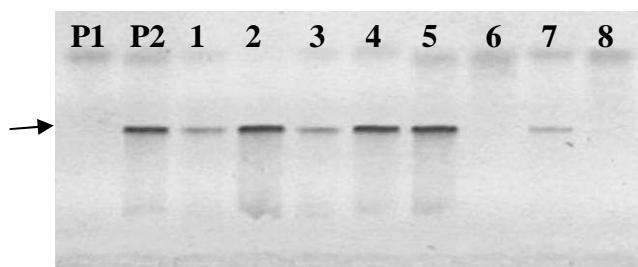
## 4.3 Molekuláris markerek gyakorlati alkalmazása

### 4.3.1 Markerre alapozott szelekció

Markerre alapozott szelekcióval támogatott nemesítési programot indítottunk az *Lr20* gén beépítésére 3 szegedi (GK Garaboly, GK Békés, GK Élet) és 1 honosított (Jubilejnaja-50) öszibúza fajtába valamint 1 fajtajelöltbe (VR95B343). A recipiens szülők a levélrozsásra fogékonyak vagy közepesen fogékonyak, de jó agronómiai és beltartalmi tulajdonságokkal rendelkeznek. Donorként a Thatcher alapú *Lr* génekre közel izogén vonalsorozat *Lr20* gént hordozó tagját (Thatcher\*6/Timmo) választottuk. Munkánk kezdetekor az irodalomban még csak egyetlen domináns öröklődésű, a rezisztencia génhez szorosan kapcsolt (0,4 cM) STS marker (*Xsts638*) volt ismeretes, amelyet Neu és mtsai (2002) írtak le, és munkájukban az *Lr20* gén diagnosztikus markereként jellemezték. Az *Xsts638* marker validálását elvégeztük a NIL *Lr20* valamint a GK Garaboly, GK Békés, GK Élet és VR95B343 szülők bevonásával. A polimorf fragmentum csak a donor szülőben amplifikálódott (25. ábra). Az F<sub>2</sub> egyedeken elvégeztük a rezisztencia gén kimutatását a molekuláris markerrel, és azokkal az egyedekkel, amelyek hordozták a markert, a Jubilejnaja-50 fajtával visszakeresztezési programot indítottunk. Az *Lr20* gén jelenlétét minden BC generációban vizsgáltuk az *Xsts638* marker segítségével (26. ábra). Az második visszakeresztezés után a törzseket szántóföldön vetettük el, és értékeltük a természetes levélrozsda fertőzés utáni rezisztenciájukat. A törzsek között levélrozsda ellenállóságbeli különbséget találtunk. Szántóföldi mintavételezés és a markerre alapozott szelekció után azzal a két törzssel, amelyek rezisztensek voltak és a molekuláris markert is tartalmazták, vonalszaporítást indítottunk. Jelenleg ezek a vonalak szántóföldi kísérleteinkben szerepelnek.



**25. ábra.** Az *Xsts638 Lr20* rezisztencia génre specifikus molekuláris marker validálása a keresztezésbe bevont fajtákkal. A nyíl a markert jelöli. P1=NIL *Lr20*; P2=GK Élet; P3=GK Békés; P4=GK Garaboly; P5=Jubilejnaja-50; P6=VR95B343.



**26. ábra.** Az *Lr20* gén kimutatása az *Xsts638* markerrel a BC<sub>2</sub> utódokban (Jubilejnaja-50//Garaboly/NIL *Lr20*). A nyíl a molekuláris markert jelöli. P1=Jubilejnaja-50; P2=NIL *Lr20*; 1-8 minta=BC<sub>2</sub> utódok.

#### 4.3.2 *Lr* gének azonosítása búzafajtákban molekuláris markerek segítségével

Az *Lr34* gént a Magyarországon 1970-2005 között regisztrált őszi búza fajták (n=222) közül 51-ben (23,0 %) valamint az 1960-ban elismert Bezostaja-1-ben sikerült kimutatni a *csLV34* marker (Lagudah és mtsai 2006) segítségével (10. táblázat). Összehasonlítva a két legnagyobb magyar nemesítőház három évtizedes programját az *Lr34* gén közel azonos gyakorisággal fordul elő: a szegedi fajták 23,9 %-ában (n=71), a martonvásári fajták 20 %-ában (n=70). Magyarországon nemcsak az említett két nemesítőház búzafajtái terjedtek el az utóbbi három évtizedben, hanem más, kisebb magyar nemesítő intézetekből (n=16) és európai országokból (n=65) (Ausztria, Románia, Szlovákia, Szerbia,



Franciaország, Cseh Köztársaság, Horvátország, Bulgária, Ukrajna, Németország, Hollandia) származó fajták is.

Az egyéb magyar nemesítésű fajták 31,3 %-a, a hazánkban regisztrált európai fajták 23,1 %-a hordozza a rezisztencia gént. Az általunk vizsgált európai fajtákon belül a német, ukrán és holland fajtákban az *Lr34* gén nem volt kimutatható (11. táblázat).

**10. táblázat.** Az *Lr52*, *Lr20* és *Lr34* gének jelenléte a Magyarországon 1971-2005 között elismert ősibúza fajtákban

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	<i>Lr20/Sr15/Pm1</i>				<i>Lr34/Yr18</i>	<i>Lr52</i>	
				<i>Xwmc809</i>	<i>Xgwm344</i>	<i>Xwmc274</i>	<i>Xsfs638</i>		<i>XcsLV34</i>	<i>Xgwm234</i>
Bezostaja-1	RUS	1960		0	0	0	0	1	0	0
Kavkaz	RUS	1970	1977	1	1	0	0	1	0	0
Avrora	RUS	1970	1976	1	1	0	0	0	0	0
Jubilejnaja-50	UA	1970	-	1	1	0	0	0	0	0
Vitka	UA	1970	-	1	1	0	0	0	0	0
GK3	HU-GK	1971	1977	1	1	0	0	1	0	0
GKF-2	HU-GK	1971	1980	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 1	HU-Mv	1971	1980	1	1	0	0	1	0	0
Burgas-2	BG	1972	1974	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 2	HU-Mv	1972	1977	1	1	0	0	0	0	0
Kompolti-1	HU	1973	1981	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 3	HU-Mv	1973	1977	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 4	HU-Mv	1974	1990	1	1	0	0	0	0	0
Saturnus	SRB	1974	1981	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 5	HU-Mv	1976	1985	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 6	HU-Mv	1976	1981	1	1	0	0	0	0	0
NS-Rana-1	SRB	1976	1981	1	1	0	0	0	0	0
NS-Rana-2	SRB	1976	1987	1	1	0	0	0	0	0
Partizanka	SRB	1976	1981	0	0	1	1	0	0	0
GK Tiszatáj	HU-GK	1977	1985	1	1	0	0	1	0	0
GK Szeged	HU-GK	1978	1985	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 7	HU-Mv	1978	1985	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 8	HU-Mv	1978	1990	1	1	0	0	0	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	Lr20/Sr15/Pm1				Lr34/Yr18	Lr52	
				Xwmc809	Xgwm344	Xwmc274	Xsts638		XcsLV34	Xgwm234
Sixtus	CRO	1980	1985	1	1	0	0	0	0	0
Baranjka	CRO	1980	1990	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 9	HU-Mv	1980	1993	1	1	0	0	0	0	0
GK Boglár	HU-GK	1981	1987	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 10	HU-Mv	1981	1990	1	1	0	0	1	0	0
Beauchamp	FR	1982	1990	1	1	0	0	0	0	0
GK Ságvári	HU-GK	1982	1990	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 11	HU-Mv	1982	1987	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 12	HU-Mv	1982	1994	1	1	0	0	0	0	0
Zagrepcanka	CRO	1983	1991	1	1	0	0	1	0	0
Lonja	CRO	1983	1990	1	1	0	0	1	0	0
GK Kincső	HU-GK	1983	1994	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 13	HU-Mv	1983	1987	1	1	0	0	1	0	0
Ukrainka	SK	1983	1993	1	1	0	0	1	0	0
FD-5	FR	1985	1991	1	1	0	0	0	0	0
GK Öthalom	HU-GK	1985	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Zombor	HU-GK	1985	1996	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 14	HU-Mv	1985	1993	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 15	HU-Mv	1985	1998	1	1	0	0	0	0	0
Adriana	CRO	1987	-	1	1	0	0	0	0	0
Alföld	HU	1987	-	1	1	0	0	1	0	0
Viginta	HU	1987	2002	1	1	0	0	1	0	0
GK István	HU-GK	1987	1992	1	1	0	0	0	0	0
GK Szőke	HU-GK	1987	1996	1	1	0	0	1	0	0
GK Bence	HU-GK	1987	1992	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 16	HU-Mv	1987	2001	1	1	0	0	0	0	0
Korona	CRO	1988	2001	1	1	0	0	0	0	0
GK Örzse	HU-GK	1988	1992	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 17	HU-Mv	1988	2002	1	1	0	0	1	0	0
Danka	SRB	1988	1994	1	1	0	0	1	0	0
Ana	CRO	1990	1996	1	1	0	0	0	0	0
Kompolti3	HU	1990	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Barna	HU-GK	1990	2000	1	1	0	0	0	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	Lr20/Sr15/Pm1				Lr34/Yr18	Lr52	
				Xwmc809	Xgwm344	Xwmc274	Xsts638		XcsLV34	Xgwm234
Martonvásári 18	HU-Mv	1990	1994	1	1	0	0	0	0	0
GK Kata	HU-GK	1991	2000	1	1	0	0	0	0	0
GK Csűrös	HU-GK	1991	2000	1	1	0	0	0	0	0
GK Őrség	HU-GK	1991	2003	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 22	HU-Mv	1991	1998	1	1	0	0	1	0	0
Martonvásári 19	HU-Mv	1991	2001	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 20	HU-Mv	1991	1998	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 21	HU-Mv	1991	2001	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 23	HU-Mv	1991	2001	1	1	0	0	0	0	0
Super Zlatna	FR	1992	2000	1	1	0	0	0	0	0
Gaspard	FR	1992	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Délibáb	HU-GK	1992	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Olt	HU-GK	1992	2000	1	1	0	0	1	1	1
GK Góbé	HU-GK	1992	2007	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 24	HU-Mv	1992	1998	1	1	0	0	0	0	0
Fatima2	HU-RO	1992	2005	1	1	0	0	1	0	0
GK Zugoly	HU-GK	1993	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Pinka	HU-GK	1993	-	1	1	0	0	0	0	0
Martonvásári 25	HU-Mv	1993	2001	1	1	0	0	0	0	0
Mv Koma	HU-Mv	1993	2001	1	1	0	0	0	0	0
Mv Magma	HU-Mv	1993	2001	1	1	0	0	0	0	0
Mv Optima	HU-Mv	1993	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Csörnöc	HU-GK	1994	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Marcal	HU-GK	1994	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Répce	HU-GK	1994	2003	1	1	0	0	0	0	0
Mv Pálma	HU-Mv	1994	-	1	1	0	0	1	0	0
Mv Vilma	HU-Mv	1994	2005	1	1	0	0	1	0	0
Mv Emma	HU-Mv	1994	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Irma	HU-Mv	1994	2001	1	1	0	0	0	0	0
Mv Szigma	HU-Mv	1994	2005	0	0	1	1	0	0	0
Kondor	HU-SK	1995	-	1	1	0	0	0	0	0
Erik	AT	1996	2003	1	1	0	0	0	0	0
Boka	CZ	1996	2003	1	1	0	0	1	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	Lr20/Sr15/Pm1				Lr34/Yr18	Lr52	
				Xwmc809	Xgwm344	Xwmc274	Xsts638		XcsLV34	Xgwm234
Gabi	CZ	1996	2003	1	1	0	0	1	0	0
GK Hattyas	HU-GK	1996	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Véka	HU-GK	1996	2004	1	1	0	0	0	0	0
GK Kalász	HU-GK	1996	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Malmos	HU-GK	1996	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Szindbád	HU-GK	1996	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Kende	HU-GK	1996	2003	1	1	0	0	1	0	0
GK Élet	HU-GK	1996	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Magdaléna	HU-Mv	1996	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Madrigál	HU-Mv	1996	2002	1	1	0	0	0	0	0
Mv Matador	HU-Mv	1996	2003	1	1	0	0	0	0	0
Bercy	NL	1996	2003	1	1	0	0	0	0	0
Brutus	AT	1997	-	1	1	0	0	0	0	0
Lindana	AT	1998	-	1	1	0	0	1	0	0
Ludwig	AT	1998	-	1	1	0	0	1	0	0
Lupus	AT	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Brea	CZ	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Maximus	DE	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Győző	FR	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Buzogány	FR	1998	-	1	1	0	0	1	0	0
Flori2	FR	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Rivoli	HU	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
HP Árkus	HU	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Hunor	HU	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Favor	HU-GK	1998	2004	1	1	0	0	0	0	0
GK Sára	HU-GK	1998	2004	1	1	0	0	0	0	0
GK Miska	HU-GK	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Mérő	HU-GK	1998	2003	1	1	0	0	1	0	0
GK Garaboly	HU-GK	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Cipó	HU-GK	1998	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Mura	HU-GK	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Dávid	HU-GK	1998	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Kunság	HU-GK	1998	2003	1	1	0	0	0	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	Lr20/Sr15/Pm1				Lr34/Yr18	Lr52	
				Xwmc809	Xgwm344	Xwmc274	Xsts638		XcsLV34	Xgwm234
Mv Martina	HU-Mv	1998	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Tamara	HU-Mv	1998	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Magvas	HU-Mv	1998	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Kucsma	HU-Mv	1998	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Mezőföld	HU-Mv	1998	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Summa	HU-Mv	1998	2002	1	1	0	0	0	0	0
Pobeda	SRB	1998	2004	1	1	0	0	1	0	0
Jarebica	SRB	1998	2004	1	1	0	0	0	0	0
Carlo	AT	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
Complet	DE	1999	2004	1	1	0	0	0	0	0
Abony	HU	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
Hajdúság	HU	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Tenger	HU-GK	1999	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Verecke	HU-GK	1999	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Forrás	HU-GK	1999	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Petur	HU-GK	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Jászság	HU-GK	1999	2004	1	1	0	0	0	0	0
Mv Csárdás	HU-Mv	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
Alex	RO	1999	-	1	1	0	0	1	0	0
Róna	SRB	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
Renesansa	SRB	1999	-	1	1	0	0	0	0	0
Capo	AT	2000	-	1	1	0	0	N	0	0
Furore	AT	2000	2005	1	1	0	0	0	0	0
Niagara	CZ	2000	-	1	1	0	0	0	0	0
Bőség	FR	2000	-	1	1	0	0	0	0	0
MF Kazal	FR	2000	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Szálka	HU-GK	2000	2003	1	1	0	0	0	1	1
GK Rába	HU-GK	2000	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Szivárvány	HU-GK	2000	2004	1	1	0	0	0	0	0
GK Bagoly	HU-GK	2000	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Sas	HU-GK	2000	2004	1	1	0	0	0	0	0
Mv Mariska	HU-Mv	2000	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Prizma	HU-Mv	2000	2005	1	1	0	0	0	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	Lr20/Sr15/Pm1				Lr34/Yr18	Lr52	
				Xwmc809	Xgwm344	Xwmc274	Xsts638		XcsLV34	Xgwm234
Mv Dalma	HU-Mv	2000	2005	1	1	0	0	1	0	0
Mv Emese	HU-Mv	2000	-	1	1	0	0	1	0	0
Mv Palotás	HU-Mv	2000	-	1	1	0	0	1	0	0
Mv Matild	HU-Mv	2000	2005	1	1	0	0	0	0	0
Zlatka	SRB	2000	-	1	1	0	0	1	0	0
Thesee	UA	2000	-	1	1	0	0	0	0	0
Carolina	AT	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
Borcsa	CZ	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
Balada	CZ	2001	-	1	1	0	0	1	0	0
Boszanova	CZ	2001	-	0	0	1	1	0	0	0
GK Csongrád	HU-GK	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Jutka	HU-GK	2001	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Margit	HU-GK	2001	2003	1	1	0	0	0	0	0
GK Attila	HU-GK	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Héja	HU-GK	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Holló	HU-GK	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Tündér	HU-GK	2001	2004	1	1	0	0	0	0	0
Mv Mambo	HU-Mv	2001	-	1	1	0	0	1	0	0
MV Panna	HU-Mv	2001	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Verbunkos	HU-Mv	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Amanda	HU-Mv	2001	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Marsall	HU-Mv	2001	-	1	1	0	0	0	0	0
Fabula	AT	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Rusija	AT	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Eureka	FR	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Orpic	FR	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Guarni	FR	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
KG Magor	HU	2002	-	1	1	0	0	1	0	0
KG Kunhalom	HU	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Cinege	HU-GK	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Rubintos	HU-GK	2002	2004	1	1	0	0	0	0	0
GK Smaragd	HU-GK	2002	2004	1	1	0	0	0	0	0
GK Ledava	HU-GK	2002	-	1	1	0	0	0	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	Lr20/Sr15/Pm1				Lr34/Yr18	Lr52	
				Xwmc809	Xgwm344	Xwmc274	Xsts638		XcsLV34	Xgwm234
GK Hattyú	HU-GK	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Ködmön	HU-Mv	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Suba	HU-Mv	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Süveges	HU-Mv	2002	-	1	1	0	0	0	0	0
Dunai	AT	2003	-	1	1	0	0	0	1	1
Száva	AT	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
HP-Pusztaszél	HU	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Kiskun Gold	HU	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Piacos	HU-GK	2003	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Tisza	HU-GK	2003	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Kapos	HU-GK	2003	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Hargita	HU-GK	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Garmada	HU-Mv	2003	-	1	1	0	0	1	0	0
Mv Béres	HU-Mv	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Matyó	HU-Mv	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Mazurka	HU-Mv	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Piroska	HU-Mv	2003	2005	1	1	0	0	0	0	0
Mv Toborzó	HU-Mv	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Walzer	HU-Mv	2003	-	1	1	0	0	0	0	0
Bitop	AT	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
Bill	DE	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
MF Boglya	FR	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
KG Széphalom	HU	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
MV Táltos	HU-Mv	2004	-	1	1	0	0	1	0	0
Mv Hombár	HU-Mv	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
MV Kemence	HU-Mv	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Regiment	HU-Mv	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
Bobino	NL	2004	-	1	1	0	0	0	0	0
Cornelusus	AT	2005	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Szala	HU-GK	2005	-	1	1	0	0	1	0	0
GK Békés	HU-GK	2005	-	1	1	0	0	-	-	-
GK Csillag	HU-GK	2005	-	1	1	0	0	0	0	0
GK Hunyad	HU-GK	2005	-	1	1	0	0	0	0	0

Fajta neve	eredet*	elismerés éve	visszavonás éve	<i>Lr20/Sr15/Pm1</i>				<i>Lr34/Yr18</i>	<i>Lr52</i>	
				<i>Xwmc809</i>	<i>Xgwm344</i>	<i>Xwmc274</i>	<i>Xsts638</i>		<i>XcsLV34</i>	<i>Xgwm234</i>
Mv Kolo	HU-Mv	2005	-	1	1	0	0	0	0	0
Mv Vekni	HU-Mv	2005	-	1	1	0	0	0	0	0

\* AT=Ausztria (n=15); B=Bulgária (n=1) CRO=Horvátország (n=7); CZ=Cseh Köztársaság (n=7); DE=Németország (n=3); FR=Franciaország (n=13); HU=kisebb magyar nemesítőházak (n=16); HU-GK=Gabonakutató Nonprofit Kft., Szeged (n=71); HU-Mv=MTA Agrártudományi Központ Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár (n=70); NE=Hollandia (n=2); RO=Románia (n=1); RUS=Oroszország (n=3); SK=Szlovákia (n=1); SRB=Szerbia (n=10); UA=Ukrajna (n=3), ahol n=az adott helyről származó fajták száma

1=molekuláris marker jelenléte; 0=molekuláris marker hiánya

**11. táblázat.** A Magyarországon 1970 és 2005 között regisztrált őszi búzafajták összefoglalása a molekuláris markerrel azonosított *Lr34* gén alapján

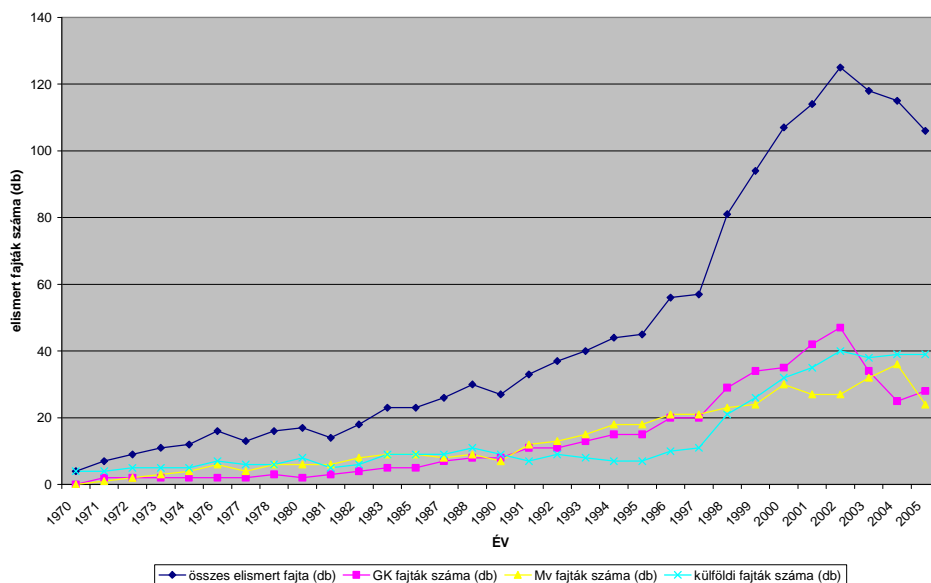
eredet	Fajták száma	Fajták <i>Lr34</i> génnel száma (%)
Magyarország-GK	71	17 (23,9)
Magyarország-Mv	70	14 (20,0)
Magyarország-egyéb	16	5 (31,3)
Magyarország összes	157	36 (22,9)
Ausztria	15	2 (13,3)
Bulgária	1	1 (100,0)
Cseh Köztársaság	7	3 (42,8)
Franciaország	13	1 (7,6)
Hollandia	2	0 (0,0)
Horvátország	7	2 (28,5)
Németország	3	0 (0,0)
Oroszország	2	1 (50,0)
Románia	1	1 (100,0)
Szerbia	10	3 (30,0)



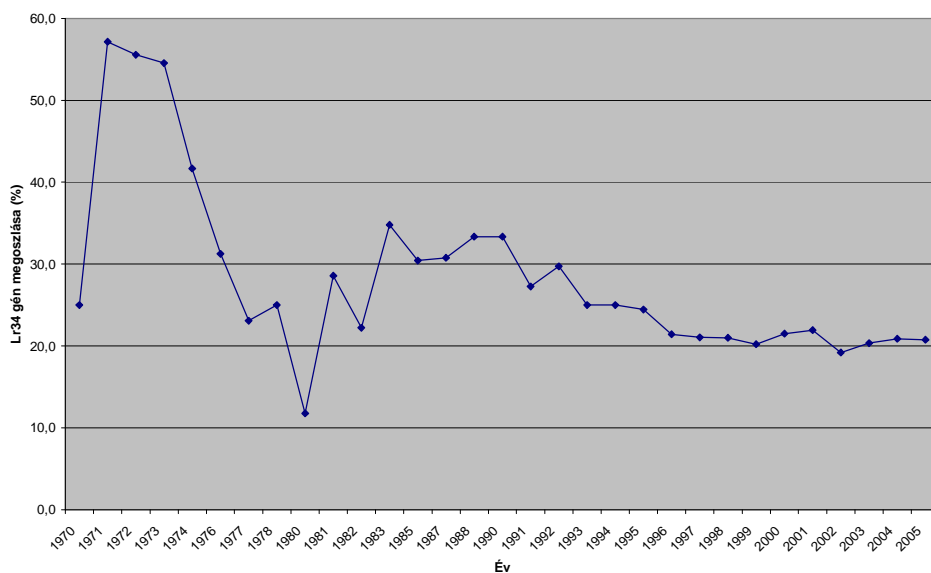
eredet	Fajták száma	Fajták Lr34 génnel száma (%)
Szlovákia	1	1 (100,0)
Ukrajna	3	0 (0,0)
Külföldi összes	65	15 (23,1)
Összesen	222	51 (23,0)

Az *Lr34* gén gyakorisága jobban tanulmányozható, ha azt évenkénti megoszlásban vizsgáljuk az összes, az adott évben érvényes állami elismeréssel rendelkező búzafajtához viszonyítva (27-31. ábra). Az *Lr34* gén megoszlása a 222 vizsgált búzafajtában 11,8 % (1980) és 57,1 % (1971) között változott. Az általunk vizsgált búzafajtákban az *Lr34* először az 1960-ban elismert orosz Bezosztaja 1 fajtában jelent meg. Az általunk részletesen vizsgált időszak (1970-2005) fajtái közül szintén az orosz eredetű Kavkaz volt (állami elismerés 1970-ben) az első olyan fajta, amelyben megfigyeltük az *Lr34* gént. A 70-es években további *Lr34*-s fajták jelentek meg: 4 db szegedi: GK 3, GK F2 (1971), GK Tiszatáj (1977) és GK Szeged (1978), 2 db martonvásári: Martonvásári 1 (1971) és Martonvásári 3 (1973), valamint egy bolgár: Burgas-2 (1972). Az egyéb magyar nemesítőházak által elismert, a rezisztencia gént is hordozó őszi búzafajta 1987-ig nem volt jelen (10. táblázat). Az *Lr34* gén előfordulása az 1971-1974-ig tartó időszakban volt a legmagasabb az adott évben állami elismeréssel rendelkező fajtákban (41,7-57,1 %) (28. ábra). Arányuk 1980-ra étmenetileg lecsökkent (mindössze két szegedi fajtában, a GK Tiszatájban és GK Szegedben volt azonosítható), majd 1983 és 1990 között újra megnőtt (33,3-34,8 %). Miután az első elismert, az *Lr34* gént is hordozó külföldi fajtákat visszavonták, 1977 és 1982 között csak magyar nemesítésű *Lr34* fajtákkal találkozhatunk (31. ábra). Az *Lr34* gén gyakoriságában, 1992-től kezdődően az ezredfordulóig folyamatos csökkenés figyelhető meg. Meg kell jegyezni, hogy a gént hordozó fajták arányának csökkenése ellenére az *Lr34* fajták száma általában növekszik, mivel az adott évben állami elismeréssel rendelkező fajták száma a megfigyelési időszak kezdete és vége között megtízszereződött (27. ábra). A 2005. évi adatokat értékelve megállapíthatjuk, hogy az akkor köztermesztésben lévő államilag elismert fajták (n=105) közül a szegedi és a martonvásári fajták hordozzák a legnagyobb százalékban (25 %) az *Lr34* gént. A két nemesítőház programjában az ezredfordulótól kezdve az *Lr34* gén gyakorisága az

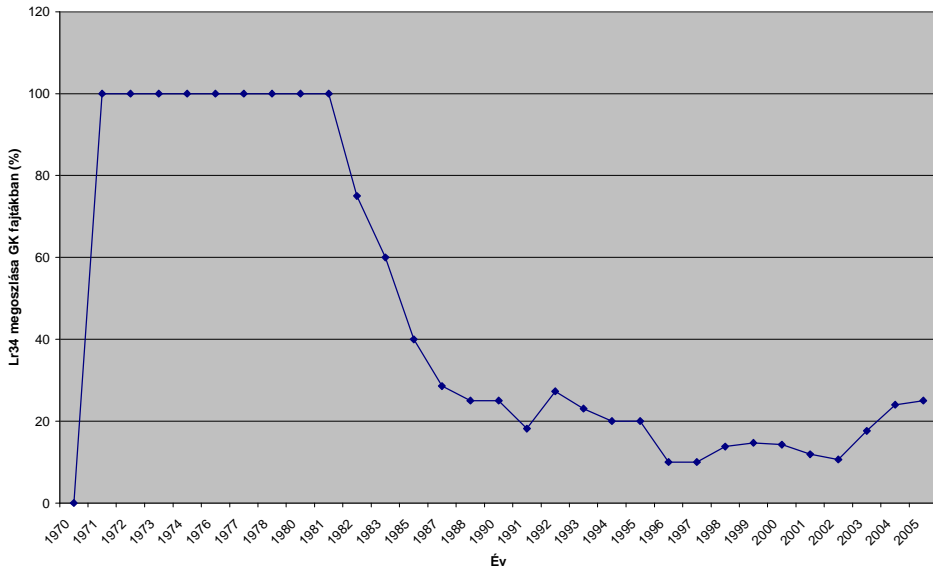
elismert fajtákban stagnáló tendenciát mutat az egyéb magyar és külföldi nemesítésű fajtákhoz hasonlóan (29-31. ábra).



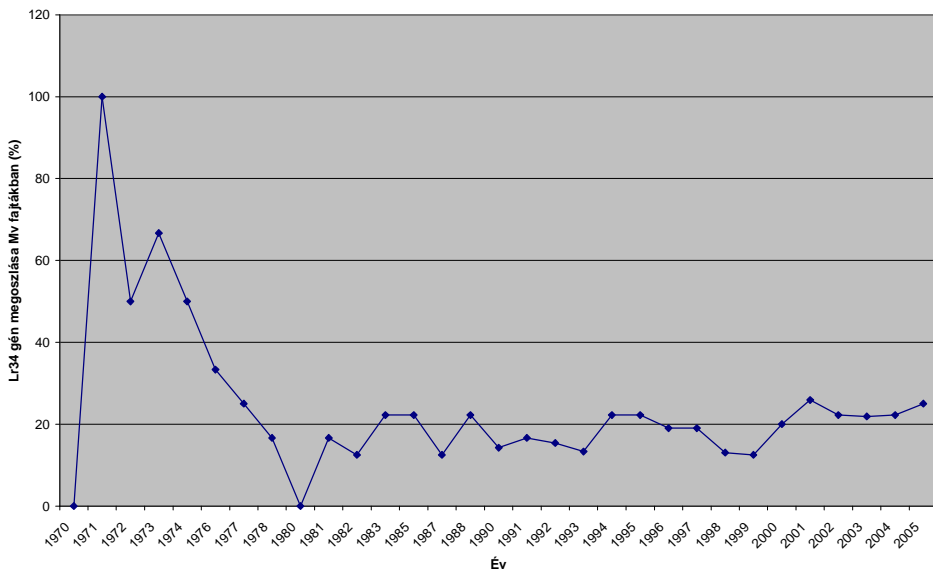
**27. ábra.** 1970-2005 között az adott évben érvényes állami elismeréssel rendelkező búzafajták számának alakulása nemesítőházanként



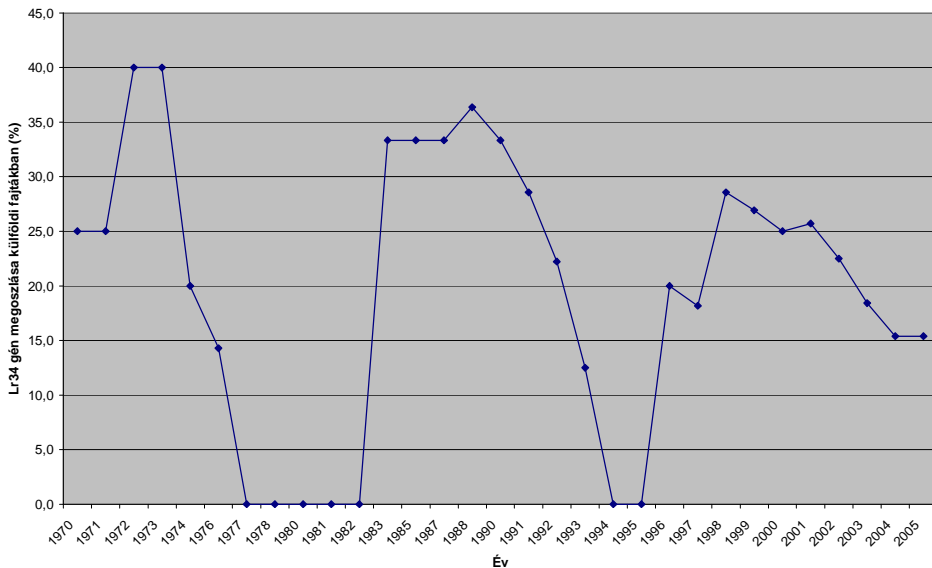
**28. ábra.** Az Lr34 gén megoszlása az 1970-2005 között az adott évben állami elismeréssel rendelkező búzafajtákban



**29. ábra.** Az *Lr34* gén megoszlása az 1970-2005 között, az adott évben állami elismeréssel rendelkező GK búzafajtákban



**30. ábra.** Az *Lr34* gén megoszlása az 1970-2005 között, az adott évben állami elismeréssel rendelkező martonvásári búzafajtákban



**31. ábra.** Az *Lr34* gén megoszlása az 1970–2005 között, az adott évben állami elismeréssel rendelkező külföldi búzafajtákban

A természetes levélrozsda fertőzöttségi adatok a vizsgált fajták 72,1 %-ánál volt hozzáférhető 1985 és 2003. között. Mivel az MgSzH kísérletek minden évben más-más fajtaszortimentet tartalmaztak, ezért a természetes levélrozsda fertőzési adatokat évenként értékeltük (1985, 1988, 1994, 1997, 1999, 2000, 2001, 2002 és 2003). Kiszámoltuk az adott év fertőzési átlagát, illetve megnéztük a legerősebben fertőződött fajta értékét (fertőzési maximum). Ez utóbbit az értékeléskor 100 %-nak véve négy fertőzési csoportot alakítottunk ki: rezisztensnek vettük azokat a fajtákat, amelyek a fertőzési maximumhoz viszonyítva 0-25 % fertőzést mutattak, mérsékelten rezisztensnek, amelyek 25,1-50 %, mérsékelten fogékonyak az 50,1-75 % és fogékonyak a 75,1-100 % fertőzést mutató fajtákat. Az értékelés során azok a fajták, amelyekben azonosítottuk az *Lr34* gén molekuláris markerét a rezisztens, mérsékelten rezisztens és mérsékelten fogékony csoportokba tartoztak. A t-próba alapján két járványos év adatai szerint (1988 és 1997) valamint 1985 és 2002 évben szignifikáns különbség tapasztalható az *Lr34* gént hordozó és nem hordozó fajták fertőzöttségi százalékának átlaga között. (12. táblázat).

**12. táblázat.** Az *Lr34* gén hatékonysága szántóföldön a rezisztencia géneket hordozó és nem hordozó fajtákban az MgSzH által publikált fertőzöttségi adatok szerint 1985-2003 között

Évek	Vizsgált fajták száma		Fajták fertőzöttségi százalékának átlaga (%)	
	<i>Lr34</i> gén nélkül	<i>Lr34</i> génnel	<i>Lr34</i> gén nélkül	<i>Lr34</i> génnel
1985	15	9	52,32	33,25*
1988	24	12	67,33	39,78*
1994	27	7	36,78	33,43
1997	40	11	48,05	28,36*
1999	48	12	35,75	28,25
2000	53	15	23,38	22,13
2001	62	16	28,87	22,79
2002	65	18	52,98	11,22*
2003	61	16	17,92	19,31
Átlag			40,38	26,50*

A \*-gal jelölt években a Student-próba (P=5%) elvégzése után szignifikáns különbség figyelhető meg az adott évben a fajták fertőzöttségi százalékának átlaga között.

Molekuláris markerek segítségével az *Lr20* gént a Partizánka, az Mv Szigma és a Boszanova fajtákban azonosítottuk, amely a 222 vizsgált fajtához viszonyítva 1,3 %-os gyakoriságot jelent. A 3 búzafajtában az *Lr20* gén mind a 4 markerrel elkülöníthető volt. Míg az *Xsts638* STS és *Xwmc273* SSR marker csak az említett három fajtában amplifikálta a polimorf fragmentumot, addig az *Xwmc809* és *Xgwm344* repulzív fázisban volt jelen (10. táblázat), azaz csak a fenti 3-fajtában nem volt jelen a polimorf fragmentum, a többiben igen.

Az *Lr52* gént szintén három fajtában (GK Olt, GK Szálka, Dunai) azonosítottuk az *Xgwm234* SSR és *Xtxw200* STS markerek segítségével (10. táblázat). A GK Olt szegedi fajtában az *Lr52* gén mellett az *Lr34* gént is kimutattuk.



## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Munkánk során öt molekuláris markerezési technikát (RAPD, AFLP, RGAP, SSR és STS) alkalmaztunk kapcsolt molekuláris markerek azonosítására két, Magyarországon közepesen hatékony *Lr* gén (*Lr52* és *Lr20*) esetében. Kísérleteinkben az *Lr52* génnel kapcsoltan öröklődő új RAPD és SSR markereket, az *Lr20* génnel pedig kapcsoltan öröklődő új SSR markereket azonosítottunk. Bár az AFLP és RGAP technika alkalmazásakor nagy számú primerkombináció tesztelését végeztük el (AFLP esetén 82 db, RGAP esetén 48 db), kapcsolt markereket nem sikerült azonosítani ezekkel a módszerekkel. Munkánk során megállapítottuk, hogy az általunk létrehozott térképezési populációkban a kapcsolt markerek azonosítására a leghatékonyabb markerkeresési technika a kromoszómaspecifikus SSR volt: *Lr20* gén esetén a tesztelt 48 db SSR primerből hat marker, az *Lr52* gén esetében a 44 db SSR primerből szintén hat marker mutatott kapcsoltságot. Az SSR markerek használata a markerre alapozott szelekcióban egyszerű, és gyors. A kapcsolt markerek alkalmazásának megkönnyítésére nincs szükség speciális SCAR vagy STS markerek kialakítására. Az SSR markerek általában kodomináns öröklődésűek, ami további előnyüket növeli a többi technikával szemben a szelekcióban való alkalmazáskor, hiszen segítségükkel már a növénynemesítés korai szakaszában azonosíthatók a céltulajdonságra homozigóta egyedek.

### 5.1 Az *Lr20* gén molekuláris markerezési eredményeinek értékelése, következtetések

Kodomináns és könnyen detektálható markerek, mint a SSR markerek általában jobban alkalmazhatóak a markerre alapozott szelekcióban, mint a domináns markerek. Munkánkban 6 db új, az *Lr20* génnel szorosan kapcsolt SSR markert azonosítottunk. A Neu és mtsai (2002) által diagnosztikus STS markerként leírt *Xsts638*-at szintén bevontuk vizsgálatainkba. Megfigyeléseink alapján a NIL*Lr20* (rezisztens) és GK Délibáb (fogékony) fajta keresztezésével előállított F2 térképezési populációban azonban ez a marker távolabbra térképeződött, mint Neu és mtsai (2002) vizsgálataiban (4,6 cM szemben a 0,4 cM-nal). Eredményeink alátámasztják Khan és mtsai (2005) által közölt adatokat,

akik az *Lr20* és az *Xsts638* genetikai távolságát szintén nagyobbak (7,1 cM) mérték. Neu és mtsai (2002) az említett STS markeren kívül számos, a rezisztencia génnel együtt öröklődő RFLP és két SSR markert is azonosítottak. Ez utóbbiak (*Xgwm282* és *Xgwm332*) azonban túl nagy távolságra (32,8 cM) térképeződtek a rezisztencia géntől. Az általunk azonosított 6 db SSR marker közül 5 db (*Xcfa2240*, *Xgwm344*, *Xwmc273*, *Xwmc525* és *Xwmc809*) még az *Xsts638* markernél is szorosabb kapcsoltságot (4,6 cM) mutatott.

Bár az SSR markerek általában kodomináns módon öröklődnek, munkánkban érdekes módon két olyan SSR markert (*Xwmc809* és *Xgwm344*) is azonosítottunk, amelyek dominánsan, ráadásul repulzióként öröklődtek, azonban e két marker mutatta legszorosabb kapcsoltságot (0,5 cM) az *Lr20* génhez. Bár a két első tulajdonság nemesítési szempontból bizonyos hátrányt jelent, adataink alapján eddig mégis ez a két marker öröklődik a legszorosabban az *Lr20* génhez. Az általunk térképezett 6 db SSR markerből 3 db (*Xwmc273* 2,8 cM, *Xwmc525* 3,3 cM és *Xcfa2240* 3,8 cM) 10 cM-on belül térképeződött és kodomináns öröklődést mutatott, így ezek könnyebben használhatók a MAS során, ugyanakkor a rezisztenciagéntől való távolságuk sem túl nagy a hatékony szelekciós munkához.

Neu és mtsai (2002) 12 olyan markert azonosított, amelyek az *Lr20* rezisztencia génnel kapcsolatosan öröklődtek, azonban e markerek közül egy sem akadt, amely a rezisztencia gén disztális oldalán helyezkedett volna el. Munkánkban azonban sikerült azonosítani egy SSR markert (*Xcfa2257*) 12,8 cM távolságra a rezisztencia gén disztális oldalán. Ez azt is jelenti, hogy az *Lr20* gén nem a kromoszóma kar legvégén helyezkedik el, mivel a gén és a kromoszóma vége között még jelentős (legalább 12,8 cM) távolság van.

McIntosh (1977) leírta, hogy az *Lr20* rezisztencia gén az *Lr20-Sr15-Pm1* génkomplexum tagja, mely géneket korábban a 7A kromoszóma hosszú karjára térképeztek (Watson és Luig, 1966; Sears és Brigg, 1969). McIntosh (1977) a három rezisztencia gén kapcsoltságáról megállapította továbbá, hogy míg az *Lr20-Sr15* teljesen kapcsolatosan, addig a *Pm1* rezisztencia gén szorosan kapcsolatosan, de az *Lr20-Sr15* génkomplextől függetlenül öröklődik. A rekombináció hiánya (Neu és mtsai, 2002) felveti a lehetőségét annak, hogy a 7AL kromoszóma e régiója esetleg idegen fajból eredő transzlokációt tartalmaz. Bár az *Lr20* rezisztencia gén őseinek McIntosh (1995) a Thew nevű *Triticum aestivum* fajtát nevezte meg, ez nem zárja ki, hogy ez a *Lr* gén akár idegen fajból is eredhet.



## 5.2 Az *Lr52* gén molekuláris markerezésének értékelése, következtetések

Munkánkban 6 db SSR (*Xcfd20*, *Xgwm133*, *Xgwm234*, *Xgwm443*, *Xwmc149* és *Xwmc630*), 1 db STS (*Xtxw200*) és 1 RAPD (*Xopr10*) kapcsolt markert térképeztünk az *Lr52* génhez. Az SSR markerek közül az *Xgwm234* 7,2 cM távolságra térképeződött a rezisztencia géntől, így a MAS-ra jól használható. Hiebert és mtsai (2005) SSR markerek segítségével azonosították az *Lr52* gén helyét a genomban (5BS kromoszóma). Vizsgálatainkban az *Xgwm133*-at 48,1 cM-ra, az *Xwmc149*-et 28,5 cM-ra és az *Xgwm344*-et 16,5 cM-ra térképezték a rezisztencia géntől. Munkájukban a rezisztencia génhez legközelebbre térképezett SSR marker tehát az *Xgwm344* volt, mely a rezisztencia gén proximális oldalán helyezkedett el ellentétben a mi vizsgálatainkkal. Továbbá vizsgálataink során azt találtuk, hogy térképezési populációinkban az *Xwmc149* marker sokkal közelebb térképeződik az *Lr52* rezisztencia génhez, mint Hiebert és mtsai (2005) munkájában (11,3 cM szemben a 28,5 cM-nal). Eredményeink alapján az *Xwmc149* SSR marker is alkalmas a markerre alapozott szelekcióra.

Obert és mtsai (2005) egy iráni fajtában (PI289824) új *Lr* gént azonosítottak. Somers és mtsai (2004) a búza 42 kromoszómájára térképezett SSR markerek segítségével az 5BS kromoszómára lokalizáltak ezt a gént, és így lehetségesnek tartották, hogy azonos az *Lr52* génnel. Munkájukban az új rezisztencia génnel a következő SSR markerek mutattak kapcsoltságot: *Xbarc21*-5BS (47,4 cM), az *Xgwm443*-5BS (16,7 cM), az *Xgwm234*-5BS (7,8 cM) és az *Xgwm544*-5BS (41,1 cM). Eredményeinkhez hasonlóan Obert és mtsai (2005) is az új rezisztencia gén disztális oldalára térképezték az *Xgwm443* markert. Munkánk során az általuk kapcsoltnak talált másik 3 db SSR-t (*Xbarc21*, *Xgwm234* és *Xgwm544*) is teszteltük, de populációinkban csak a *gwm234* amplifikált polimorf fragmentumot. A kapcsoltsági vizsgálat után megállapítottuk, hogy az általunk azonosított 6 SSR marker közül az *Xgwm234* helyezkedik el az *Lr52* rezisztencia génhez a legközelebb (7,2 cM). Obert és mtsai (2005) az általunk azonosított új rezisztencia génhez szorosan kapcsolt AFLP markert is azonosítottak, melyet STS markerré konvertáltak, és *Xtxw200*-nak nevezték el. Miután az SSR vizsgálatok eredményeiben hasonlóságot találtunk, megvizsgáltuk a *Xtxw200* STS marker kapcsoltságát is az általunk létrehozott F<sub>2</sub> populációban. Eredményeink azt mutatták, hogy populációinkban mind az *Xgwm234*, mind a *Xtxw200* marker a gén proximális oldalán helyezkedik el

ellentétben Obert és mtsai (2005) publikációjával, ahol az *Xtxw200* az új rezisztencia gén disztális oldalán található. Ezek az eredmények nyitva hagyják azt a kérdést, hogy az Obert és mtsai (2005) által azonosított rezisztencia gén azonos-e az általunk vizsgált *Lr52* génnel vagy csak nagyon közel helyezkedik el hozzá. Ennek tisztázására érdemes lenne elvégezni az allélikus tesztet a két gén között.

### **5.3 Markerre alapozott szelekció és *Lr* gének azonosítása molekuláris markerek segítségével búzafajtákban**

A markerre alapozott szelekció során gondot okoz, ha a szenzitív, vagyis a célgént nem tartalmazó recipiens szülő is az adott rezisztenciagén markerrel azonos méretű DNS fragmentumot hordoz. Ekkor az adott marker az adott hibridkombinációban szelekciós célra hasznavehetetlen. Nemesítési szempontból ezért olyan markerek tekinthetők ideálisnak, amelyek a célgént nem tartalmazó fajták egyikében sem amplifikálnak a specifikus markerrel azonos méretű DNS fragmentet. A gyakorlat szempontjából ezért is előnyös, ha egy adott génnek több markere is rendelkezésünkre áll. A marker gyakorlatban való alkalmazhatóságának felméréséhez ezért előbb el kell végezni az adott marker validálását különböző genetikai háttérrel rendelkező őszi búza fajtákon is. Az *Lr20* génhez kapcsolt *Xsts638* marker validálását az általunk keresztezési partnerként alkalmazott búzafajtákon (GK Garaboly, GK Békés, GK élet, Jubilejnaja-50, VR95B343) mi is elvégeztük, és alkalmasnak találtuk a rezisztencia gén azonosítására.

A gyakorlati alkalmazás szempontjából ugyanakkor a markerekkel kapcsolatos eredmények laboratóriumtól függetlenül jól ismételhetőnek kell lenniük. Blaszyk és mtsai (2008) számos *Lr* rezisztenciagén marker, köztük az *Lr20* gén *Xsts638* markerének validálását is elvégezték. Ők több laboratórium bevonásával vizsgálták e marker ismételhetőségét, megbízhatóságát, amelynek során bebizonyosodott, hogy jól alkalmazható a gyakorlati nemesítésben. Az általunk indított, az *Lr20* rezisztencia gén beépítésére törekvő visszakeresztezéses program kezdetekor még csak a Neu és mtsai (2002) által azonosított *Xsts638* domináns öröklődésű marker állt rendelkezésünkre, ezért a rezisztencia gén nyomon követése ezzel a markerrel történt. Azonban a MAS-ra a legalkalmasabbak a kodomináns öröklődésű SSR markerek, amelyekkel már akár az  $F_2$  generációban kiszűrhetőek a homozigóta egyedek. Az

*Lr20* gén markerszelekciós munkájára a továbbiakban ezért már az általunk azonosított SSR markereket célszerű felhasználni.

Bár az *Lr20* gén Magyarországon önmagában közepesen hatékony a levélrozsda fertőzés ellen (Vida és mtsai 2009), mégis célszerű a nemesítési programokba bevonni a genetikai diverzitás növelése érdekében akár más levélrozsda rezisztencia génekkel kombinálva is.

Az *Lr* génekhez kapcsolt molekuláris markerek egyik gyakorlati alkalmazása a rezisztencia gének azonosítása az egyes őszi búza fajtákban. Ezzel a módszerrel a gének azonosítására szánt idő lerövidíthető, hiszen már csíranövénykorban elvégezhető a tesztelés. Stepien és mtsai (2003) három *Lr* gént (*Lr10*, *Lr26* és *Lr37*) azonosítottak molekuláris markerek segítségével 37 európai búzafajtákban. E búzafajták többségét Winzeler és mtsai (2000) is vizsgálták fiatalkori levélrozsda inokulációs módszerrel. Stepien és mtsai (2003) miután a saját és az irodalmi adatokat összevetették, mindössze egy esetben találtak eltérő eredményt a fiatalkori inokuláció és a molekuláris marker alkalmazása közben.

Vizsgálatainkban 222 Magyarországon 1970. és 2005. között regisztrált őszi búza fajtában határoztuk meg az *Lr34*, *Lr20*, és *Lr52* rezisztencia géneket e génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek segítségével.

Az *Lr34* gént a Magyarországon 1970-2005 között regisztrált őszi búza fajtákban a Lagudah és mtsai (2006) által leírt kodomináns STS (*XcsLV34* 0,4 cM) marker segítségével azonosítottuk. A marker validálását különböző búzafajták vizsgálatával már elvégezték. Singh és mtsai (2007) ezt a molekuláris markert sikerrel alkalmazták markerre alapozott szelekciós programjukban az *Lr34* gén átvitelére fogékony fajtákba. Wang és mtsai (2009) szintén sikerrel alkalmazták a *csLV34* markert az *Lr34* gén azonosítására 226 martonvásári fajtában és nemesítési vonalban. Vizsgálataik során 12 db államilag elismert martonvásári búzafajtában mutatták ki a marker jelenlétét: Martonvásári 3, Martonvásári13, Martonvásári 17, Mv Emese, Mv Garmada, Mv Gorsium, Mv Laura, Mv Mambó, Mv Pálma, Mv Palotás, Mv Táltos és Mv Vilma. A felsorolt fajtákban az Mv Gorsium és az Mv Laura (általunk nem vizsgált) kivételével mi is azonosítottuk az *Lr34* gén molekuláris markerét.

Az általunk vizsgált 222 fajta 23,0 %-a hordozza az *Lr34* gént, amelyek közül a legkorábban (1960-ban) elismert az orosz Bezosztaja 1 fajta volt (ezt a Bezosztaja 4 fajtából szelektálták az oroszországi Krasznodárban). Az általunk részletesen vizsgált időszak (1970-2005) fajtái közül szintén a Krasznodári eredetű Kavkaz (Lutescens314-h-

147/Bezostaja 1) volt (magyar állami elismerés 1970-ben) az első olyan fajta, amelyben megfigyeltük az *Lr34* gént. A 70-es években további *Lr34*-s fajták jelentek meg: az 1971-ben elismert GKF 3 és GKF 2 (mindkettő Fe Ko 33/Produttore//Bezostaja 1 kombináció) és a Martonvásári 1 (Mironovskaja 808/Bezostaja 1//Bezostaja 1), 1972-ben a bolgár Burgasz 2 (G16/Bezostaja 4) majd 1973-ban a Martonvásári 3 (Bezostaja 1/Fertődi 293), a 1977-ben elismert GK Tiszatáj (Bezostaja 1/Fiorello) és 1978-ban a GK Szeged (Strampelli/Marco Michaelles//Bezostaja 1). A felsorolásból is látható, hogy a felsorolt fajták mindegyikében az *Lr34* gén a Bezostaja 1 fajtára, vagy annak ősére a Bezostaja 4-re vezethető vissza. Vida és mtsai (2009) szintén a Bezostaja 1 kiemelkedő szerepét hangsúlyozzák az *Lr34* gén hazai elterjesztésében. Dyck és Samborsky (1982) számos búzafajtában azonosította ezt a gént szerte a világon. Winzeler és mtsai (2002) az általuk vizsgált európai fajták 55 %-ánál mutattak ki felnőttkori rezisztenciát, amelyről feltételezték, hogy vagy az *Lr13* vagy az *Lr34* gén vagy ezek kombinációja okozza. Kolmer és mtsai (2008) kanadai, amerikai, ausztrál, európai és orosz fajták vizsgálatakor megállapították, hogy az *Lr34* gén eredete Európában a Bezostaja 1 orosz fajtának, Amerikában pedig túlnyomórészt a Frontana fajta nemesítési partnerként történő alkalmazásának köszönhető. Az *XcsLV34* marker jelenlétét a Bezostaja 1 fajtában mi is azonosítottuk. E búzafajta nagy produktivitása, kiváló szárszilárdsága, télállósága és betegség-ellenállósága miatt igen népszerű volt a külföldi és a hazai búzatermelésben és a nemesítési programokban egyaránt. Az *Lr34* gén hazai elterjedése nagyrészt a Bezostaja 1-nek köszönhető. A gént a GK Verecke fajtában is megtaláltuk és ennek szülői között (GK Pusztaszer/Bezostaja 1) szintén szerepel a Bezostaja-1 fajta. Manninger (1996) vizsgálataiban az Martonvásári 22 és GK Olt fajtákban is feltételezte az *Lr34* gén jelenlétét – munkánkban e két fajtában is sikerült azonosítani a molekuláris markert. Szintén Manninger (1996) azonosította az *Yr18* sárgarozsda rezisztencia gént, amely az *Lr34* génnel McIntosh (1992) és Singh (1992) szerint is szoros kapcsolatban öröklődik, az alábbi, általunk is vizsgált fajtákban: Bezostaja 1, Martonvásári 1, Martonvásári 3, Martonvásári 4, Martonvásári 5, Martonvásári 7, Martonvásári 9, Martonvásári 11, Martonvásári 12, Martonvásári 14, GK Tiszatáj, Jubilejnaja-50. Munkánk során az említettek közül a Bezostaja 1, Martonvásári 1, Martonvásári 3 és GK Tiszatáj fajtákban mutattuk ki az *Lr34* génnel kapcsoltan öröklődő molekuláris markert.

A rendelkezésünkre álló természetes levélorozsda fertőzöttségi adatok (az MgSzH által közölt adatok) évenkénti értékelése után

megállapítottuk, hogy az *Lr34* gént hordozó fajták többsége a rezisztens csoportba tartozik. Mivel ez a rezisztencia gén önmagában közepesen hatékony (Mesterházy és mtsai 2000), ezért feltételezhető, hogy más felnőttkori rezisztenciában megnyilvánuló génnel (pl.: *Lr13*) (Singh és mtsai 2000) vagy egy önmagában közepesen hatékonynak, vagy hatékonynak mondott rasszspecifikus rezisztencia génnel kombinálva van jelen a fajtákban (Kolmer és Oelke 2006). Bár az ezredfordulótól kezdve az *Lr34* gén gyakorisága stagnál a Magyarországon elismert fajtákban, mégis e gén rezisztencianemesítésben való alkalmazása hasznos lehet a fajták tartós rezisztenciájának kialakítása során.

Az *Lr20* gén *Triticum aestivum* eredetű, és kapcsolatosan öröklődik a *Pm1* lisztharmat, valamint az *Sr15* szárrozsda rezisztencia génekkel (Watson és Luig 1966; Sears és Briggie 1969). Munkánkban az *Xsts638* (Neu és mtsai 2002) és három általunk azonosított SSR marker (*Xwmc809*, *Xgwm344*, *Xwmc273*) segítségével azonosítottuk a fajtákban az *Lr20* gént. A 222 vizsgált fajtából mindössze 3 (1,3 %) hordozza a gént. Eredményeink hasonlóak voltak, mint Winzeler és mtsai (2000) valamint Singh és mtsai (2001a) által leírtak, akik az általuk vizsgált európai illetve angol fajták 4 %-ában találták meg az *Lr20* gént speciális levélrozsda izolátumok segítségével.

Az *Lr52* gén búzafajtákban való előfordulását mindössze néhány fajtában említik (McIntosh és mtsai 1995). Munkánkban az általunk azonosított, a génhez szorosan kapcsolt (7,2 cM) SSR markerrel (*Xgwm234*) azonosítottuk a rezisztencia gén jelenlétét a 222 vizsgált fajtából 2 szegedi és egy osztrák nemesítésű búzafajtában. Magyarországon Manninger (2002) és Csősz (2007) is vizsgálta az *Lr52* gén csíranövénykori és felnőttkori rezisztenciáját, és megállapították, hogy közepesen hatékony gén. Bár az *Lr52* gén nem gyakori, mégis a felnőttkori rezisztencia eredmények alapján javasolható az új fajtákba való beépítése más hatékony rasszspecifikus vagy felnőttkori rezisztenciát is okozó *Lr* génekkel kombinációban. Tekintve, hogy az alkalmazott markerek és az adott *Lr* gének kapcsoltsága nem teljes, további tesztek (kórtani tesztek speciális levélrozsda izolátumokkal) is szükségesek a gének jelenlétének igazolásához.

A rezisztens fajták eddig ismeretlen genetikai hátterének feltárása (rezisztenciagének azonosítása) valamint az egyre népszerűbbé váló MAS alkalmazása remélhetőleg rövid időn belül felgyorsítja a rezisztencia gének céltudatos beépítését a nemesítési vonalakba és új fajtákba a tartós rezisztencia elérése érdekében.

## 5.4 Új tudományos eredmények

*Munkánk során az alábbi új eredményeket értük el:*

1. Hat új, az *Lr20* génhez kapcsolt SSR (*Xcfa2240*, 3,8 cM, *Xwmc525*, 3,3 cM, *Xwmc273*, 2,8 cM, *Xwmc809*, 0,5 cM, *Xgwm344* 0,5 cM, *Xcfa2257*, 12,8 cM) markert azonosítottunk és térképeztünk.
2. Sikerült azonosítani egy, az *Lr20* gén disztális oldalán elhelyezkedő SSR markert (*Xcfa2257*, 12,8 cM).
3. Térképező populációnkban az *Xsts638* (0,4 cM; Neu és mtsai 2002) domináns markert jelentősen távolabbra (4,9 cM-ra) térképeztük az *Lr20* géntől.
4. Új RAPD (*Xopr10*, 18,2 cM), STS (*Xtxw200*, 3,6 cM) és 6 SSR (*Xgwm133*, 22,1 cM, *Xgwm234*, 7,2 cM, *Xgwm443*, 44,6 cM, *Xwmc149*, 11,3 cM, *Xwmc630*, 26,9 cM és *Xcfd20*, 46,5 cM) markert azonosítottunk és térképeztünk az *Lr52* génhez.
5. Az *Lr52* génhez kapcsolt általunk azonosított markerek közül az *Xtxw200* (3,6 cM) domináns öröklődésű STS, valamint az *Xgwm234* (7,2 cM) és az *Xwmc149* (11,3 cM) kodomináns öröklődésű SSR közelebb térképeződött, mint az irodalomból ismert *Xgwm443* (16,5 cM; Hiebert és mtsai 2005).
6. 1970-2005 között Magyarországon elismert őszi 222 db búzafajtánkban molekuláris markerek segítségével azonosítottuk az *Lr52*, *Lr20* és *Lr34* géneket és mértük gyakoriságukat. Megállapítottuk, hogy mind az *Lr52*, mind az *Lr20* gén igen alacsony gyakorisággal (1,3%) fordult elő. Az *Lr34* gén viszont jelentős mértékben elterjedt a hazánkban termesztett fajtánkban (23,0 %-os gyakoriság).
7. A fajták 1985 és 2003 között megfigyelt szántóföldi természetes fertőzöttségi adatai alapján megállapítottuk, hogy az *Lr34* gént hordozó fajták több év átlagában szignifikánsan rezisztensebbek, mint a gént nem hordozók.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Magyarországon az őszi búza egyik legveszélyesebb betegsége a levélrozsdá (*Puccinia recondita* Rob. ex Desmaz. f. sp. *tritici* /Erikss./, syn.: *Puccinia triticina* Eriks.), amely a fajták fogékonyságától, valamint a környezeti tényezőktől függően akár 40 % feletti termésveszteséget is okozhat. A rezisztens fajták előállítása a kórokozó variabilitása miatt komoly kihívás a növénynevelők számára. Egy vagy több rezisztencia gén egy búzafajtába történő beépítésének hagyományos módja rendkívül idő- és munkaigényes folyamat. Az utóbbi években elterjedt molekuláris marker technikák alkalmazásával ez a munka jelentősen egyszerűsíthető és lerövidíthető. A molekuláris markerek gyakorlati alkalmazásának fontos területe a markerekre alapozott szelekció és a búzafajták és nemesítési alapanyagok genetikai jellemzése (pl. agronómiailag fontos rezisztenciagének azonosítása). E munkák előfeltétele, hogy a kívánt génekre nézve minél szorosabb kapcsolatban öröklődő markerek álljanak rendelkezésünkre.

Kísérleteinkben célul tűztük ki 1.) az *Lr20* és az *Lr52* levélrozsdá rezisztencia génekhez szorosan kapcsolt molekuláris markerek azonosítását és térképezését; 2.) az *Lr20* gén már ismert kapcsolt STS markerének (*Xsts638*) validálását és alkalmazását visszakereszteléses nemesítési programban a markerre alapozott szelekció segítségével; 3.) az *Lr20*, *Lr52* és *Lr34* gének azonosítását molekuláris markerekkel a Magyarországon 1970 és 2005 között elismert őszi búzafajtákban.

Az *Lr20* gén az őszi búza 7AL kromoszómáján található. A rezisztencia génhez kapcsolt markerek térképezéséhez a Thatcher alapú közel izogén vonal RL6092 (Thatcher\*6/Timmo; NIL *Lr20*) mint rezisztens és a GK Délibáb mint fogékony szülő keresztezésével 119 egyedből álló F<sub>2</sub> térképezési populációt állítottunk elő. Összesen 82 Pst/Mse AFLP, 48 RGAP primerkombináció, 1 STS és 48, a 7AL kromoszómára specifikus SSR primer vizsgálatát végeztük el molekuláris markerek azonosítása céljából. A Neu és mtsai (2002) által diagnosztikusként leírt *Xsts638* (0,4 cM) markert térképezési populációnkban 4,6 cM távolságra térképeztük. Munkánk során sikerült azonosítani és térképezni 4 új kodomináns öröklődésű (*Xwmc273* - 2,8 cM, *Xwmc525* - 3,3 cM, *Xcfa2240* - 3,8 cM, *Xcfa2257* - 12,8 cM), és 2 új domináns öröklődésű (*Xgwm344* - 0,5 cM és *Xwmc809* - 0,5 cM) az *Lr20*

génhez kapcsolt SSR markert. Neu és mtsai (2002) 12 olyan markert azonosítottak, amelyek domináns öröklődésűek voltak és a rezisztencia génnel kapcsoltan öröklődtek, azonban e markerek között egy sem akadt, amely a rezisztencia gén disztális oldalán helyezkedett volna el. Kísérleteink során azonban sikerült azonosítani egy, a rezisztencia gén disztális oldalára térképeződő SSR markert: *Xcfa2257* (12,8 cM). Ez azt is jelentheti, hogy Neu és mtsai (2002) feltevéseivel ellentétben az *Lr20* gén nem a kromoszómakar legvégén helyezkedik el.

Irodalmi adatok alapján az *Lr52* gén az 5BS kromoszómán helyezkedik el. A kapcsolt molekuláris markerek térképezéséhez az RL6107 (Thatcher\*6/V336; NIL *Lr52*) rezisztens és GK Délibáb fogékony szülő keresztezésével egy 267 egyedből álló F<sub>2</sub> térképezési populációt hoztunk létre. A kapcsoltág igazolásához specifikus levélrozsda razzsal való mesterséges inokulációval végeztük el a populáció fenotipizálását. Összesen 280 RAPD, 44 SSR és 8 STS primert használtunk a két szülő és a Thatcher közötti polimorfizmus kimutatására. Mindössze egy RAPD (OPR10), 6 SSR (gwm133, gwm234, gwm443, wmc149, wmc630 és cfd20) valamint 1 STS (txw200) primer amplifikált polimorf fragmentumot. Az F<sub>2</sub> populáció 267 egyedével elvégzett kapcsoltági elemzés során a markereket 3,6 cM és 46,5 cM közötti távolságra térképeztük az *Lr52* géntől. A rezisztencia gén disztális oldalára térképeződött az *Xgwm443* (44,6 cM), *Xgwm133* (22,1 cM), *Xgwm234* (7,2 cM) SSR és az *Xtxw200* (3,6 cM) STS marker. A gén proximális oldalára az *Xcfd20* (46,5), *Xwmc630* (26,9 cM) és *Xwmc149* (11,3 cM) SSR valamint az *Xopr10* (18,2 cM) RAPD markereket térképeztük.

Az *Lr20* génhez szorosan kapcsolt *Xsts638* marker hitelesítését végeztük el, majd alkalmaztuk az általunk indított visszakereszteséses markerre alapozott szelekciós programban. Munkánk eredményeként rendelkezésünkre áll egy, a rezisztencia gént homozigóta állapotban hordozó törzs, amely a további nemesítési programokban is felhasználható.

Magyarországon 1975 és 2005 között regisztrált 222 őszi búzafajta valamint az 1960-ban elismert Bezosztaja 1 vizsgálatát végeztük el az *Lr34*, *Lr20* és *Lr52* gének azonosítása céljából molekuláris markerek segítségével. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy míg az *Lr52* és *Lr20* gyakorisága igen ritka a hazai búzaszortimentben (mindössze 3-3 fajtaban fordultak elő), addig az *Lr34* gén jelentősen elterjedt (51 fajtaban azonosítottuk). A fajták 1985 és 2003 között megfigyelt szántóföldi természetes fertőzöttségi adatai alapján az *Lr34* gént hordozó fajták több évben szignifikánsan rezisztensebbek voltak, mint a gént nem hordozók.



Bár az *Lr20* és *Lr52* gén elterjedése a fajtákban nem gyakori, mégis a variabilitás növelése érdekében célszerű e két gént is bevinni más gének mellé a nemesítési programokba. Az *Lr34* gén gyakorisága ugyan az ezredfordulótól kezdve stagnál a Magyarországon elismert fajtákban, mégis e gén rezisztencianemesítésben való alkalmazása hasznos lehet a fajták tartós rezisztenciájának kialakítása során. A rezisztens fajták eddig ismeretlen genetikai hátterének feltárása (rezisztenciagének azonosítása) valamint az egyre népszerűbbé váló MAS alkalmazása remélhetőleg felgyorsítja a rezisztencia gének céltudatos beépítését a nemesítési vonalakba és új fajtákba a tartós rezisztencia elérése érdekében.



## 7. SUMMARY

Leaf (brown) rust caused by *Puccinia triticina* Erikss. is one of the most important fungal diseases of wheat worldwide. Under favourable conditions for pathogens, it may cause more than 40% yield loss in susceptible cultivars. Breeding of resistant cultivars is very difficult for the breeders because of the variability of pathogens. The classical resistance breeding of building in one or more resistance genes into one cultivar is a very laborious and time-consuming procedure. In recent years, DNA-based marker techniques have held out the prospect to make the long phase of such procedures considerably shorter. The important areas of the practical applications of the linked molecular markers are the MAS and the genetic characterization of cultivars and breeding lines (identification of agronomically important resistance genes).

The objectives of this study were 1.) to identify and map PCR based, closely linked molecular markers for two race-specific leaf rust resistance genes, *Lr52* and *Lr20*; 2.) to validate and use the *Xsts638* marker of *Lr20* in back-cross breeding program by marker assisted selection; 3.) to identify of *Lr52*, *Lr20* and *Lr34* genes in Hungarian wheat genotypes (registered 1970-2005) by molecular markers.

The *Lr20* gene has been mapped on the chromosome 7AL of *Triticum aestivum* L. A cross was made between the resistant, *Lr20*-bearing, Thatcher-derived nearly isogenic line RL6092 (Thatcher\*6/Timmo, NIL *Lr20*) and the susceptible cultivar GK Délibáb from Szeged, Hungary. The resulting F<sub>2</sub> (119 plants) population was screened for leaf rust reaction in the seedling stage by artificial infection. A total of 82 Pst/Mse AFLP and 48 RGAP primer combinations, one STS and 48 SSR markers covering the 7AL chromosome were used for identifying markers associated to *Lr20* gene. No linkage was found by AFLP and RGAP methods. In this study six SSR and one STS markers were mapped closely linked to *Lr20* gene. The most closely linked SSRs, *Xgwm344* and *Xwmc809* were dominantly inherited, each with a 0.5 cM distance and in repulsion phase to the dominant *Lr20* gene. The *Xwmc273*, *Xwmc525* and *Xcfa2240* markers were followed by the co-dominant (in coupling phase, too, and at distances of 2.8, 3.3 and 3.8 cM, respectively) inheritance and mapped to proximal part of resistance gene. In previous studies no marker was observed distally to *Lr20*; however, in our experiments one of the SSR markers, *Xcfa2257* was found located

distally to the *Lr20* locus at a distance of 12.8 cM. A previously identified diagnostic dominant marker, *Xsts638*, linked to 0.4 cM to *Lr20* (Neu et al. 2002) was also tested in this population; this marker, however, showed a recombination value of 4.6 cM to *Lr20*.

The *Lr52* race-specific gene originated from *Triticum aestivum* L. and located on chromosome 5BS. A mapping population of 267 F<sub>2</sub> plants derived from a cross between RL6107 (Thatcher\*6/V336; NIL *Lr52*) near-isogenic line as resistant and GK Délibáb as susceptible parent were screened for leaf rust reaction in the seedling stage by artificial infection with a specific race. A total of 280 RAPD, 44 SSR and 8 STS primers were used to test the two parents and Thatcher. In this set one RAPD (OPR10), 6 SSRs (gwm133, gwm234, gwm443, wmc149, wmc630, and cfd20) and one STS (txw200) generated polymorphic DNA fragments. The linkage of these markers to the *Lr52* was tested using 267 F<sub>2</sub> progenies and they were mapped in an interval of 3.6–46.5 cM. The position and orientation of these markers to the *Lr52* was as follows: SSR markers *Xgwm443* (44.6 cM), *Xgwm133* (22.1 cM), *Xgwm234* (7.2 cM) and the STS marker *Xtxw200* (3.6 cM) were mapped on the distal side of *Lr52*, while the *Xcfd20* (46.5cM), *Xwmc630* (26.9 cM), *Xopr10* (18,2 cM) and *Xwmc149* (11.3 cM) ones were located proximal to the gene.

The *Xsts638* closely linked marker of *Lr20* gene was used in our marker assisted selection backcross program. Validation of a molecular marker for *Lr20* in parental lines, followed by successful detection of this gene in backcross progenies from various cross combinations was carried out. Novel selected genotypes which carry the *Lr20* gene are available, useful as such, as well as for further breeding work.

In this study 222 winter wheat cultivars (registered in Hungary 1970 to 2005) and the Bezostaja 1 (registered in Hungary in 1960) were investigated using molecular markers to determine the presence or absence and frequency of three leaf rust resistance genes *Lr20*, *Lr52* and *Lr34*. The results indicated that the *Lr20* and *Lr52* genes are rare: they were found only in 3 cultivars, each. The *Lr34* gene, on the other hand, was found in 52 cultivars. In field trials (1985-2003), *Lr34* provided significant resistance over many years, except the year 2000. Despite the fact that the occurrence of *Lr20* and *Lr52* genes is not frequent in the cultivars, it would be reasonable to include these two genes, besides other genes, in the breeding programs to increase the genetic variability. Although the frequency of the *Lr34* gene stagnates in the registered cultivars since the turn of the millenary, the application of this gene might be valuable in the resistance breeding to form the long-lasting resistance of cultivars. The detection of the up-to-now unknown genetic background

of the resistant cultivars (the identification of resistance genes) and the application of the more and more acknowledged MAS technique are expected to enhance the purposeful insertion of resistance genes in the lines and novel cultivars, which will establish their long-term resistance.



## 8. MELLÉKLETEK

### 8.1 Irodalomjegyzék

- Autrique, E., R.P. Singh, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells (1995): Molecular markers for four leaf rust resistance genes introgressed into wheats from wild relatives. *Genome* 38: 75-83.
- Bansal, U.K., M.J. Hayden, B.P. Venkata, R. Khanna, R.G. Saini and H.S. Bariana (2008): Genetic mapping of adult plant leaf rust resistance genes *Lr48* and *Lr49* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 307-312.
- Barabás Z. és Matuz J. (1983): A levélrozsdá és a lisztharmat epidémia, illetve különféle rezisztencia típusok befolyása őszi búza genotípusok termésére. *Növénytermelés* 32: 193-198.
- Barett, B., J.D. Faris and J.P. Fellers (2008): Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr17a* in wheat. *Crop Science* 48: 1124-1128.
- Bennett F.G.A. (1984): Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programmes. *Plant Pathology* 33: 279-300.
- Blaszczyk, L., J. Chelkovski, V. Korzun, J. Kraic, F. Ordon, J. Ovesna, L. Purnhauser, M. Tar and G. Vida (2004): Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9: 805-817.
- Blaszczyk, L., M. Tyrka, J. Chelkowski (2005): <sup>Pst</sup>I AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat. *Journal of Applied Genetics* 46: 357-364.
- Blaszczyk, L., I. Kramer, F. Ordon, J. Chelkowski, M. Tyrka, G. Vida and I. Karsai (2008): Validity of selected DNA markers for breeding leaf rust resistant wheat. *Cereal Research Communication* 36: 201-213.
- Bolton, M.D., J.A. Kolmer and D.F. Garvin (2008): Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology* 9: 563-575.

- Bossolini, E., S.G. Krattinger and B. Keller (2006): Development of simple sequence repeat markers specific for the *Lr34* resistance region of wheat using sequence information from rice and *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1049-1062.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnik, R.W. Davis (1980): Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Brown-Guedira, G.L., S. Singh and A.K. Fritz (2003): Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii subsp armeniacum*. *Phytopathology* 93: 784-789.
- Caldwell, R.M. (1968): Breeding for general and/or specific plant disease resistance. *In Proc. 3rd Int. Wheat Genetics Symposium Canberra, Australia* pp. 263-272.
- Chao, S., P.J. Sharp, A.J. Worland, E.J. Warham, R.M.D. Koebner and M.D. Gale (1989): RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 495-504.
- Chen, X.M., R.F. Line and H. Leung (1998): Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 345-355.
- Cherukuri, D.P., S.K. Gupta, A. Charpe, S. Koul, K.V. Prabhu, R.B. Singh, Q.M.R. Haq, S.V.S. Chauhan (2003): Identification of molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat. *Plant Breeding* 122: 204-208.
- Cherukuri, D.P., S.K. Gupta, A. Charpe, S. Koul, K.V. Prabhu, R.B. Singh and Q.M.R. Haq (2005): Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. *Euphytica* 143: 19-26.
- Collard, B.C.Y. and D.J. Mackill (2008): Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 557-572.



- Condit, R. S.P. Hubell (1991): Abundance and DNA sequence of two-based repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Csősz Lászlóné (2007): Növénykórtani és rezisztencia vizsgálatok az őszi búza rozstda, lisztharmat és levélfoltosságok kórokozóival. Doktori értekezés.
- Csősz M., Á. Mesterházy, J. Matuz, Z. Kertész, B. Beke, L. Cseuz, M. Papp, L. Purnhauser, Cs. Kertész and P. Fónad (2008): A búza rozsdabetegségei: rezisztenciára nemesítési eredmények és kilátások. *Növényvédelem* 44: 314-321.
- Csősz M., Á. Mesterházy, L. Szunics, G. Vida and K. Manninger (2000): Leaf rust resistance of the wheat *Lr* Near-isogenic lines in adult stage in Hungary, 1995-1999. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35: 177-185.
- Dedryver, F., M.F. Jubier, J. Thouvenin and H. Goyeau (1996): Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr24* in different wheat cultivars. *Genome* 39: 830-835.
- De Froidmont, D. (1998): A co-dominant marker for *IBL/IRS* wheat-rye translocation via multiplex PCR. *Journal of Cereal Science* 27: 229-232.
- Devos, K.M., M.D. Gale (1992): The use of random amplified DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 567-572.
- Devos, K.M., T. Millan and M.D. Gale (1993): Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 784-792
- Dyck, P.L., D.J. Samborski. (1979): Adult plant leaf rust resistance in PI 250413, an introduction of common wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 59: 329–32.
- Dyck, P.L. and D.J. Samborski. (1982): The inheritance of resistance to *Puccinia recondita* in a group of common wheat cultivars. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 24: 273-283.
- Dubcovsky, J. (2004): Marker-assisted selection in public breeding programs: the wheat experience. *Crop Science* 44: 1895–1898.
- Feuillet, C., M. Messmer, G. Schachermayr and B. Keller. (1995): Genetic and physical characterization of the *Lr1* leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum-Aestivum* L). *Molecular & General Genetics* 248: 553-562.

- Feuillet, C., S. Travella, N. Stein, L. Albar, L. Nublát and B. Keller (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 100: 15253–15258.
- Flor, H.H. (1942): Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.
- Flor, H.H. (1956): The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics* 8: 29-54.
- Flor, H.H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9: 275-296.
- Galiba G. és Tóth B. (2006): A búzagének térképezése: molekuláris markerek és kvantitatív tulajdonságokért felelős kromoszómaregiók (QTLs). p. 44-56 *In* Dudits D (ed.) A búza nemesbítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig. MTA Szegedi Biológiai Központ - Winter Fair Kft.
- Gold, J., D. Harder, F. Townley-Smith, T. Aung, J. Procunier (1999): Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines. *Electronic Journal of Biotechnology* 2(1). <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol2/issue>.
- Gupta, P.K., R.K. Varshney, P.C. Sharma and B. Ramesh (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390.
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, K.J. Edwards, P. Isaac, V. Korzun, M. Röder, M.F. Gautier, P. Joudrier, A.R. Schlatter, J. Dubcovsky, R.C. De la Pena, M. Khairallah, G. Penner, M.J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R.C.C. Wang, J.P. Hardouin, P. Jack and P. Leroy. (2002): Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 413-422.
- Gupta, P.K., A. Charpe, K.V. Prabhu and J.P. Hardouin (2006): Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1027-1036.
- Gupta, S.K., A. Charpe, S. Koul, K.V. Prabhu and Q.M.R. Haq (2005): Development and validation of molecular markers linked to an

- Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat. *Genome* 48: 823–830.
- Gupta, V.S., R.R. Khan, A.V. Rajwade, D.M.R. Reddy, P. Hosmani, S. Chavan, B.B. Dholakia, M.D. Lagu, S.A. Tamhankar, V.S. Rao and R.G. Saini (2008): Molecular mapping of leaf rust resistance gene *Lr15* in bread wheat. The 11th International Wheat Genetics Symposium proceedings. Edited by Rudi Appels Russell Eastwood Evans Lagudah Peter Langridge Michael Mackay Lynne. pp 724-726.
- Gustafson, G.D. and G. Shaner (1982): Influence of plant age on the expression of slow-mildewing resistance in wheat. *Phytopathology* 72: 746-749.
- Guyomarc'h, H., P. Sourdille, G. Charret, K.J. Edwards and M. Bernard (2002): Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1164-1172.
- Helguera, M., I.A. Khan and J. Dubcovsky (2000): Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr 47*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1137–1143.
- Helguera, M., I.A. Khan, J. Kolmer, D. Lijavetzky, L. Zhong-Qi and J. Dubcovsky (2003): PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Science* 43: 1839-1847.
- Helguera, M., L. Vanzetti, M. Soria, I.A. Khan, J. Kolmer and J. Dubcovsky (2005): PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Science* 45: 728-734.
- Herrera-Foessel, S.A., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, M. William, A. Djurle and J. Yuen (2008): Molecular mapping of a leaf rust resistance gene on the short arm of chromosome 6B of durum wheat. *Plant Disease* 92: 1650-1654.
- Herrera-Foessel, S.A. Evans, S. Lagudah, J. Huerta-Espino, M.J. Hayden, H.S. Bariana, D. Singh and R.P. Singh (2011): New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theoretical and Applied Genetics* 122: 239-249.

- Hiebert, C., J. Thomas and B. McCallum (2002): Determining the chromosomal location of the wheat leaf-rust resistance gene *LrW*. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 92–94.
- Hiebert, C., J. Thomas and B. McCallum (2005): Locating the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene *Lr52* (*LrW*) to chromosome 5B by a new cytogenetic method. Theoretical and Applied Genetics 110: 1453-1457.
- Hiebert, C.W., J.B. Thomas, B.D. McCallum and D.J. Somers (2008): Genetic Mapping of the Wheat Leaf Rust Resistance Gene *Lr60* (*LrW2*). Crop Science 48: 1020-1027.
- Hiebert, C.W., J.B. Thomas, D.J. Somers, B.D. McCallum and S.L. Fox (2007): Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat. Theoretical and Applied Genetics 115: 877-884.
- Huang, L. and B.S. Gill. (2001): An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. Theoretical and Applied Genetics 103: 1007-1013.
- Huang, L., S.A. Brooks, W. Li, J.P. Fellers, H.N. Trick and B.S. Gill (2003): Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of wheat. Genetics 164: 655–664.
- Hysing, S.C., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, A. Merker, E. Liljeroth and O. Diaz (2006): Leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance in wheat (*Triticum aestivum*) cultivars grown in Northern Europe (1992-2002). Hereditas 143: 1-14.
- Johnson, R. (1984): A critical analysis of durable resistance. Annual Review of Phytopathology 22: 309- 330.
- Khan, R.R., H.S. Bariana, B.B. Dholakia, S.V. Naik, M.D. Lagu, A.J. Rathjen, S. Bhavani and V.S. Gupta (2005): Molecular mapping of stem rust resistance in wheat. Theoretical and Applied Genetics 111: 846-850.
- Kolmer, J.A. (1996): Genetics of resistance to wheat leaf rust. Annual Review of Phytopathology 34: 435-455.
- Kolmer, J.A. and L.M. Oelke (2006): Genetics of leaf rust resistance in the spring wheats ‘Ivan’ and ‘Knudson’. Canadian Journal of Plant Pathology 28: 223–229.

- Kolmer, J.A., R.P. Singh, D.F. Garvin, L. Viccars, H.M. William, J. Huerta-Espino, F.C. Ogonnaya, H. Raman, S. Orford, H.S. Bariana and E.S. Lagudah (2008): Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Science* 48: 1841-1852.
- Korzun, V. (2002): Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 811-820.
- Kosambi, D.D. (1944): The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- Kuchel, H., R. Fox, J. Reinheimer, L. Mosionek, N. Willey, H. Bariana and S. Jefferies (2007): The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy. *Molecular Breeding* 20: 295-308.
- Lagudah, E.S., H. McFadden, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H.S. Bariana and W. Spielmeyer (2006): Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 21-30.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. (1987): Mapmaker an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Landjeva, S., V. Korzun and A. Borner (2007): Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156: 271-296.
- Limpert, E. and K. Müller (1994): Designation of pathotypes of plant pathogens. *Journal of Phytopathology* 140: 346-358.
- Ling, H.Q., Y. Zhu and B. Keller (2003): High-resolution mapping of the leaf rust disease resistance gene *Lr1* in wheat and characterization of BAC clones from the *Lr1* locus. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 875-882.
- Manninger K. (1996): A hazai búzarozsdák virulenciaváltozásainak és a búzafajták rezisztenciájának tanulmányozása az integrált védekezés érdekében. Doktori értekezés
- Manninger, K. (2000): Virulenc survey of wheat leaf rust in Hungary: races/pathotypes in 1999. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35: 421-428.

- Manninger K. (2002): Effective Resistance Genes as Sources of Resistance against Hungarian Wheat Rusts. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 38: 153-154.
- Manninger Sándorné. (2008): A búzán előforduló rozsdagombák virulencia-változásai Magyarországon. *Növényvédelem* 44: 328-332.
- Marino, C.L., J.C. Nelson, Y.H. Lu, M.E. Sorrells, P. Leroy, N.A. Tuleen, C.R. Lopes and G.E. Hart (1996): Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell). *Genome* 39: 359-366.
- Mateos-Hernandez, M., R.P. Singh, S.H. Hulbert R.L. Bowden, J. Huerta-Espino, B.S. Gill and G.B. Guedira (2006): Targeted mapping of ESTs linked to the adult plant resistance gene *Lr46* in wheat using synteny with rice. *Functional and Integrative Genomics* 6: 122–131.
- McCartney, C.A., D.J. Somers, B.D. McCallum, J. Thomas, D.G. Humphreys, J.G. Menzies and P.D. Brown (2005): Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene *Lr16* on wheat chromosome 2BSc. *Molecular Breeding* 15: 329-337.
- McIntosh, R.A. (1977): Nature of induced mutations affecting disease reaction in wheat. *In* Induced mutations against plant disease. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. pp. 551-565.
- McIntosh, R.A. (1992): Close genetic linkage of genes conferring adult-plant resistance to leaf rust and stripe rust in wheat. *Plant Pathology* 41: 523-527.
- McIntosh, R.A., Wellings C.R, and R.F. Park. (1995): Wheat rust. An atlas of resistance genes. CSIRO Australia, Melbourne and Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London.
- McIntosh, R.A., Y. Yamazaki, K.M. Devos, J. Dubcovsky, W.J. Rogers and R. Appels (2003): Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Tenth International Wheat Genetics Symposium Paestum, Italy Proceedings.
- McIntosh, R.A., J. Dubcovsky, W.J. Rogers, C.F. Morris, R. Appels, and X.C. Xia (2009): Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement. *Annual Wheat Newsletter* 55: 256-278.

- McIntosh, R.A., J. Dubcovsky, W.J. Rogers, C.F. Morris, R. Appels and X.C. Xia (2011): Catalogue of gene symbols for wheat: 2011 supplement. Annual Wheat Newsletter 57: 303-323.
- Mebrate, S.A., E. C. Oerke, H. W. Dehne and K. Pillen (2008): Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers. Euphytica 162: 457-466.
- Mesterhazy, A., P. Bartos, H. Goyeau, R. Niks, M. Csoz, O. Anderson, F. Casulli, M. Ittu, E. Jones, J. Manisterski, K. Manninger, M. Pasquini, D. Rubiales, G. Shachermayr, A. Strzmbicka, L. Szunics, M. Todorova, O. Unger, B. Vanco, G. Vida and U. Walther (2000): European virulence survey for leaf rust in wheat. Agronomie 20: 793-804.
- Michelmore, R.W., I. Paran, and R.V. Kesseli (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 9828-9832.
- Mohan, M., S. Nair, J.S. Bentur, U. Prasada Rao and J. Bennett (1994): RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm1* gene that confers resistance to biotype 0 of gall midge "*Orseolia oryzae*". Theoretical and Applied Genetics 76: 671-677.
- Mumtaz, S., A.K. Imtiaz, A. Shahid, Z. Bahadur, I. Arshad, S. Zamarud and A.S. Zahoor (2009): Development of RAPD based markers for wheat rust resistance gene cluster (*Lr37-Sr38-Yr17*) derived from *Triticum ventricosum* L. African Journal of Biotechnology 8: 1188-1192.
- Nadella, K.D., A.S. Peake, H.S. Bariana, M. Cooper, I.D. Godwin and B.J. Carroll (2002): A rapid PCR protocol for marker assisted detection of heterozygotes in segregating generations involving 1BL/1RS translocation and normal wheat lines. Australian Journal of Agricultural Research 53: 931-938.
- Naik, S., V.S. Gill, V.S.P. Rao, V.S. Gupta, S.A. Tamhankar, S. Pujar, B.S. Gill and P.K. Ranjekar. (1998): Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. Theoretical and Applied Genetics 97: 535-540.

- Nagy E.D., C. Eder, M. Molnar-Lang and T. Lelley (2003): Genetic mapping of sequence-specific PCR based markers on the short arm of the *1BL.1RS* wheat-rye translocation. *Euphytica* 132: 243-250.
- Nelson, J.C., A.E. Van Deynze, E. Autrique, M.E. Sorrells, Y.H. Lu, M. Merlino, M. Atkinson and P. Leroy (1995): Molecular mapping of wheat. Homoeologous group 2. *Genome* 38: 516-524.
- Nelson, J.C., R.P. Singh, J.E. Autrique and M.E. Sorrells. (1997): Mapping genes conferring and suppressing leaf rust resistance in wheat. *Crop Science* 37: 1928-1935.
- Neu, C., N. Stein and B. Keller (2002): Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. *Genome* 45: 737-744.
- Obert, D.E., A.K. Fritz, J.L. Moran, S. Singh, J.C. Rudd and M.A. Menz. (2005): Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1439-1444.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
- Paran, I. and R.W. Michelmore (1993): Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 985-993.
- Parlevliet, J.E. (1975): Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei* I. Effect of cultivar and development stage on latent period. *Euphytica* 24: 21-27.
- Pathan, A.K. and R.F. Park (2006): Evaluation of seedling and adult plant resistance to leaf rust in European wheat cultivars. *Euphytica* 149: 327-342.
- Prins, R., J.Z. Groenewald, G.F. Marais, J.W. Snape and R.M.D. Koeber. (2001): AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 618-624.
- Procunier, J.D., T.F. Townley-Smith, S. Fox, S. Prashar, M. Gray, W.K. Kim, E. Czarnecki and P.L. Dyck (1995): PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29*



- and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics and Breeding* 49: 87-92.
- Purnhauser, L. (2006): Molekuláris markerek a rezisztenciagének nyomon követéséhez. p. 289-299. *In* Dudits D (ed.) A búza nemesbítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig. MTA Szegedi Biológiai Központ - Winter Fair Kft
- Purnhauser, L., M. Csósz, M. Tar, és Á. Mesterházy (2008): Molekuláris markerek felhasználása a búza rozsdabetegségekkel szembeni rezisztencia nemesítésében. *Növényvédelem* 7: 333-339.
- Purnhauser, L., L. Bóna and L. Láng (2011a): Identification of Sr31 and Sr36 stem rust resistance genes in wheat cultivars registered in Hungary. *Cereal Research Communications* 39: 53–66.
- Purnhauser, L., L. Bóna and L. Láng (2011b): Occurrence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation and of Sr36/Pm6 resistance gene cluster in wheat cultivars registered in Hungary. *Euphytica* 179:287–295
- Qiu, J.W., A.C. Schürch, N. Yahiaoui, L.L. Dong, H.J. Fan, Z.J. Zhang, B. Keller and H.Q. Ling (2007): Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 159–168.
- Raupp, W.J., S. Sukhwinder, G.L. Brown-Guedira and B.S. Gill (2001): Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 347-352.
- Roberts, J.J. and R.M. Caldwell (1970): General resistance (slow mildewing) to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in Knox wheat. *Phytopathology* 60: 1310
- Robert O., C. Abelard and F. Dedryver (1999): Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in wheat. *Molecular Breeding* 5: 167–175.
- Roder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.

- Roelfs, A.P., R.P. Singh and E.E. Saari (1992): Rust Disease of Wheat: Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich (1985): Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant-tissues. *Plant Molecular Biology* 5: 69-76.
- Rosewarne, G.M., R.P. Singh, J. Huerto-Espino, H.M. William, S. Bouchet, S. Cloutier, H. McFadden and E.S. Lagudah (2006): Leaf tip necrosis, molecular markers and *b1*-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 500–508.
- Sacco, F., E.Y. Suarez and T. Naranjo (1998): Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr3* on chromosome 6B of Sinvalocho MA wheat. *Genome* 41: 686-690.
- Samsampour, D., B.M. Zanjani, J. K. Pallavi, A. Singh, A. Charpe, S. K. Gupta and K.V. Prabhu (2010): Identification of molecular markers linked to adult plant leaf rust resistance gene *Lr48* in wheat and detection of *Lr48* in the Thatcher near-isogenic line with gene *Lr25*. *Euphytica* 174: 337-342.
- Schachermayr, G.M., H. Siedler, M.D. Gale, H. Winzeler, M. Winzeler and B. Keller (1994): Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 110-115.
- Schachermayr, G.M., M.M. Messmer, C. Feuillet, H. Winzeler, M. Winzeler and B. Keller. (1995): Identification of molecular markers linked to the *Agropyron Elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 982-990.
- Schachermayr, G.M., C. Feuillet and B. Keller (1997): Molecular markers linked for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr9* in diverse genetic backgrounds. *Molecular Breeding* 3: 65-74.
- Schnurbusch, T., S. Paillard, A. Schori, M. Messmer, G. Schachermayr, M. Winzeler and B. Keller. (2004): Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 477-484.

- Seah, S., H. Bariana, J. Jahier, K. Sivasithamparam and E.S. Lagudah (2001): The introgressed segment carrying rust resistance *Yr17*, *Lr37* and *Sr38* in wheat can be assayed by a cloned disease resistance gene-like sequence. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 600-605.
- Sears, E.R. and L.W. Briggie (1969): Mapping the gene *Pm1* for resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* on chromosome 7A of wheat. *Crop Science* 9: 96-97.
- Seyfarth, R., C. Feuillet, G. Schachermayr, M. Winzeler and B. Keller (1999): Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 554-560.
- Seyfarth, R., C. Feuillet, G. Schachermayr, M. Winzeler and B. Keller (2000): Molecular mapping of the adult plant leaf rust resistance gene *Lr13* in wheat. *Journal of Genetics and Breeding* 54: 193-198.
- Shan X., T.K. Blake and L.E. Talbert (1999): Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1072-1078.
- Singh, A., J.K. Pallavi, P. Gupta and K.V. Prabhu (2011): Identification of microsatellite markers linked to leaf rust adult plant resistance (APR) gene *Lr48* in wheat. *Plant Breeding* 130: 31-34.
- Singh, A., J.K. Pallavi, P. Gupta and K.V. Prabhu (2012): Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene *Lr25* in wheat. *Journal of Applied Genetics* 53: 19-25.
- Singh, D., R.F. Park, and R.A. McIntosh. (2007): Characterisation of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in Australian wheats using components of partial resistance and molecular markers. *Australian Journal of the Agricultural Research* 58: 1106–1114.
- Singh, R.P. (1992a): Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 82: 835-838.
- Singh, R.P. (1992b): Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Science* 32: 874-878.

- Singh, R.P., J. Huerta-Espino. and S. Rajaram (2000): Achieving near immunity to leaf rust and stripe rust in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35: 133–139.
- Singh, R.P., K. Nakamura and J. Huerto-Espino (2001c): Leaf rust resistance genes in Japanese wheat cultivars. *Breeding Science* 51: 83-87.
- Singh, D., R.F. Park and R.A.McIntosh (2001a): Inheritance of seedling and adult plant resistance to leaf rust of selected Australian spring and English winter wheat varieties. *Plant Breeding* 120: 503-507.
- Singh, D., R.F.Park and R.A.McIntosh. (2001b): Postulation of leaf (brown) rust resistance genes in 70 wheat cultivars grown in the United Kingdom. *Euphytica* 120: 205-218.
- Singh, R.P. (1992b): Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult-plant resistance to stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 82: 835-838.
- Singh, R.P. (1993) Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to Barley Yellow Dwarf Virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat. *Plant Disease* 77: 1103-1106.
- Singh, R.P. and R.A. McIntosh. (1984a): Complementary genes for resistance to *Puccinia recondita tritici* in *Triticum aestivum* I. Genetic and linkage studies. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26: 723-735.
- Singh RP, McIntosh RA. (1984b): Complementary genes for reaction to *Puccinia recondita* in *Triticum aestivum*. II. Cytogenetic studies. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26: 736–42.
- Singh, S. and R.L. Bowden (2011): Molecular mapping of adult-plant race-specific leaf rust resistance gene *Lr12* in bread wheat. *Molecular Breeding* 28: 137-142.
- Somers, D.J., P. Isaac and K. Edwards. (2004): A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1105-1114.
- Song, Q.J., E.W. Fickus and P.B. Cregan (2002): Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 286-293.

- Song, Q.J., J.R. Shi, S. Singh, E.W. Fickus, J.M. Costa, J. Lewis, B.S. Gill, R. Ward and P.B. Cregan (2005): Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 550-560.
- Spielmeier, W., R.A. McIntosh, J. Kolmer and E.S. Lagudah (2005): Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 731-735.
- Stakman, E.C., D.M. Stewart and W.Q. Loegering. (1962): Identification of physiological races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Agricultural Research Service E617. USDA, Washington, D. C.
- Stephenson, P, G. Bryan, J. Kirby, A. Collins, K. Devos, C. Busso and M. Gale (1998): Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 946-949.
- Stepien, L., L. Golka and J. Chelkowski (2003): Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. *Journal of Applied Genetics*. 44(2): 139-149.
- Suenaga, K., R.P. Singh, J. Huerta-Espino and H.M. William (2003): Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93: 881-890.
- Sun, X.C., G.H. Bai and B. Carver (2009): Molecular markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr41*. *Molecular Breeding* 23: 311-321.
- Sváb J. (1981): Biometriai módszerek a kutatásban. *Mezőgazdasági Kiadó, Budapest*. pp: 37-39. 56-61. 539. és 548.
- Szunics L., Gál M., Szunics L., Vida Gy., Láng L. és Bedő Z. (2001): Levélrozda rezisztenciagének hatékonysága martonvásári provokációs kísérletekben. *Martonvásár* 13: 18-20.
- Tar, M., L. Purnhauser and M. Csosz. (2008): Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr52* leaf rust resistance gene of wheat. *Cereal Research Communications* 36: 409-415.
- Xie, D.X., K.M. Devos, G. Moore, and M.D. Gale (1993): RFLP-based genetic maps of the homoeologous group 5 chromosomes of bread

- wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics 87: 70-74.
- Van der Plank, J.E. (1963): Plant Diseases: Epidemics and Control. Academic Press, New York, London.
- Vida G., M. Gál, A. Uhrin, O. Veisz, N.H. Syed, A.J. Flavell, Z. Wang and Z. Bedó (2009): Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. Euphytica 170: 67-76.
- Vikal, Y., P. Chhuneja, R. Singh and H.S. Dhaliwal (2004): Tagging of an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* with a microsatellite marker in wheat. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 13: 47-49.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vandelee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995): AFLP - A new technique for DNA-fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.
- Wang, Z.L., L. Láng, A. Uhrin, O. Veisz, S.D. Liu and G. Vida (2009): Identification of the *Lr34/Yr18* rust resistance gene region in a Hungarian wheat breeding programme. Cereal Research Communication 37: 431-440.
- Watson, I.A. and N.H. Luig (1966): *Sr15* - a new gene for use in the classification of *Puccinia graminis* var. *tritici*. Euphytica 15: 239-250.
- Welsh, J. and M. McClelland (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research 18: 7213-7218.
- William, H.M., D. Hosington, R.P. Singh and D. Gonzalez-Leon (1997): Detection of quantitative trait loci associated with leaf rustresistance in bread wheat. Genome 40: 253-260.
- William, M., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, S.O. Islas and D. Hoisington (2003): Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat. Phytopathology 93: 153-159.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.L. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 6531-6535.

- Winzeler, M., A. Mesterhazy, R.F. Park, P. Bartos, M. Csoz, H. Goyeau, M. Ittu, E. Jones, F. Loschenberger, K. Manninger, M. Pasquini, K. Richter, D. Rubiales, G. Schachermayr, A. Strzembicka, M. Trotter, O. Unger, G. Vida and U. Walther (2000): Resistance of European winter wheat germplasm to leaf rust. *Agronomie* 20: 783-792.
- Xu, X.Y., G.H. Bai, B.F. Carver, G.E. Shaner and R.M. Hunger (2005): Molecular characterization of slow leaf-rusting resistance in wheat. *Crop Science* 45: 758-765.
- Zhao, X.L., T.C. Zheng, X.C. Xia, Z.H. He, D.Q. Liu, W.X. Yang, G.H. Yin and Z.F. Li (2008): Molecular mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* in Chinese wheat line Zhou 8425B. *Theoretical and Applied Genetics* 117: 1069-1075.

## 8.2 A kísérletekben használt RAPD primerek jegyzéke és szekvenciája

Primer neve	Szekvencia		Primer neve	Szekvencia		Primer neve	Szekvencia
OPL-01	GGCATGACCT		OPQ-01	GGGACGATGG		OPW-01	CTCAGTGTCC
OPL-02	TGGGCGTCAA		OPQ-02	TCTGTCCGGTC		OPW-02	ACCCCGCCAA
OPL-03	CCAGCAGCTT		OPQ-03	GGTCACCTCA		OPW-03	GTCCGGAGTG
OPL-04	GACTGCACAC		OPQ-04	AGTGCCTGA		OPW-04	CAGAAGCGGA
OPL-05	ACGCAGGCAC		OPQ-05	CCGCGTCTTG		OPW-05	GGCGGATAAG
OPL-06	GAGGGAAGAG		OPQ-06	GAGCGCCTTG		OPW-06	AGGCCCGATG
OPL-07	AGGCGGGAAC		OPQ-07	CCCCGATGGT		OPW-07	CTGACGTC
OPL-08	AGCAGGTGGA		OPQ-08	CTCCAGCGGA		OPW-08	GACTGCCTCT
OPL-09	TGCGAGAGTC		OPQ-09	GGCTAACCGA		OPW-09	GTGACCGAGT
OPL-10	TGGGAGATGG		OPQ-10	TGTGCCCGAA		OPW-10	TCGCATCCCT
OPL-11	ACGATGAGCC		OPQ-11	TCTCCGCAAC		OPW-11	CTGATGCGTG
OPL-12	GGGCGGTACT		OPQ-12	AGTAGGGCAC		OPW-12	TGGGCAGAAG
OPL-13	ACCGCTGCT		OPQ-13	GGAGTGGACA		OPW-13	CACAGCGACA
OPL-14	GTGACAGGCT		OPQ-14	GGACGCTTCA		OPW-14	CTGCTGAGCA
OPL-15	AAGAGAGGGG		OPQ-15	GGGTAACGTG		OPW-15	ACACCGGAAC
OPL-16	AGGTTGCAGG		OPQ-16	AGTGCAGCCA		OPW-16	CAGCCTACCA
OPL-17	AGCCTGAGCC		OPQ-17	GAAGCCCTTG		OPW-17	GTCTGGGTT
OPL-18	ACCACCCACC		OPQ-18	AGGCTGGGTG		OPW-18	TTCAGGGCAC
OPL-19	GAGTGGTGAC		OPQ-19	CCCCCTATCA		OPW-19	CAAAGCGCTC
OPL-20	TGGTGGACCA		OPQ-20	TCGCCAGTC		OPW-20	TGTGGCAGCA
OPM-01	GTTGGTGGCT		OPR-01	TGCGGGTCCT		OPX-01	CTGGGCACGA
OPM-02	ACAACGCCTC		OPR-02	CACAGCTGCC		OPX-02	TTCCGCCACC
OPM-03	GGGGGATGAG		OPR-03	ACACAGAGGG		OPX-03	TGGCGCAGTG
OPM-04	GGCGGTTGTC		OPR-04	CCCGTAGCAC		OPX-04	CCGCTACCGA
OPM-05	GGGAACGTGT		OPR-05	GACCTAGTGG		OPX-05	CCTTTCCTC
OPM-06	CTGGGCAACT		OPR-06	GTCTACGCA		OPX-06	ACGCCAGAGG
OPM-07	CCGTGACTCA		OPR-07	ACTGGCCTGA		OPX-07	GAGCGAGGCT
OPM-08	TCTGTCCCC		OPR-OS	CCCGTTGCCT		OPX-08	CAGGGGTGGA
OPM-09	GTCTTGCAGG		OPR-09	TGAGCACGAG		OPX-09	GGTCTGGTTG
OPM-10	TCTGGCGCAC		OPR-10	CCATTCCCA		OPX-10	CCCTAGACTG
OPM-11	GTCCACTGTG		OPR-11	GTAGCCGTCT		OPX-11	GGAGCCTCAG
OPM-12	GGGACGTTGG		OPR-12	ACAGGTGCGT		OPX-12	TCGCCAGCCA
OPM-13	GGTGGTCAAG		OPR-13	GGACGACAAG		OPX-13	ACGGGAGCAA
OPM-14	AGGGTCGTTC		OPR-14	CAGGATTCCC		OPX-14	ACAGGTGCTG
OPM-15	GACCTACCAC		OPR-15	GGACAACGAG		OPX-15	CAGACAAGCC
OPM-16	GTAACCAGCC		OPR-16	CTCTGCGCGT		OPX-16	CTCTGTTCGG
OPM-17	TCAGTCCGGG		OPR-17	CCGTACGTAG		OPX-17	GACACGGACC
OPM-18	CACCATCCGT		OPR-18	GGCTTTGCCA		OPX-18	GACTAGGTGG
OPM-19	CCTTCAGGCA		OPR-19	CCTCCTCATC		OPX-19	TGGCAAGGCA



Primer neve	Szekvencia		Primer neve	Szekvencia		Primer neve	Szekvencia
OPM-20	AGGTCTTGGG		OPR-20	ACGGCAAGGA		OPX-20	CCCAGCTAGA
OPN-01	CTCACGTTGG		OPS-01	CTACTGCGCT		OPY-01	GTGGCATCTC
OPN-02	ACCAGGGGCA		OPS-02	CCTCTGACTG		OPY-02	CATCGCCGCA
OPN-03	GGTACTCCC		OPS-03	CAGAGGTCCC		OPY-03	ACAGCCTGCT
OPN-04	GACCGACCCA		OPS-04	CACCCCCTTG		OPY-04	GGCTGCAATG
OPN-05	ACTGAACGCC		OPS-05	TTGGGGCCT		OPY-05	GGCTGCGACA
OPN-06	GAGACGCACA		OPS-06	GATACCTCGG		OPY-06	AAGGCTCACC
OPN-07	CAGCCCAGAG		OPS-07	TCCGATGCTG		OPY-07	AGAGCCGTCA
OPN-08	ACCTCAGCTC		OPS-08	TTCAGGGTGG		OPY-08	AGGCAGAGCA
OPN-09	TGCCGGCTTG		OPS-09	TCCTGGTCCC		OPY-09	AGCAGCGCAC
OPN-10	ACAACCTGGGG		OPS-10	ACCGTTCCAG		OPY-10	CAAACGTGGG
OPN-11	TCGCCGAAA		OPS-11	AGTCGGGTGG		OPY-11	AGACGATGGG
OPN-12	CACAGACACC		OPS-12	CTGGGTGAGT		OPY-12	AAGCCTGCGA
OPN-13	AGCGTCACTC		OPS-13	GTCGTTCTCTG		OPY-13	GGGTCTCGGT
OPN-14	TCGTGCGGGT		OPS-14	AAAGGGGTCC		OPY-14	GGTCGATCTG
OPN-15	CAGCGACTGT		OPS-15	CAGTTCACGG		OPY-15	AGTCGCCCTT
OPN-16	AAGCGACCTG		OPS-16	AGGGGGTTC		OPY-16	GGCCAATGT
OPN-17	CATTGGGGAG		OPS-17	TGGGGACCAC		OPY-17	GACGTGGTGA
OPN-18	GGTGAGGTCA		OPS-18	CTGGCGAACT		OPY-18	GTGGAGTCAG
OPN-19	GTCCGTA CTG		OPS-19	GAGTCAGCAG		OPY-19	TGAGGGTCCC
OPN-20	GGTGCTCCGT		OPS-20	TCTGGACGGA		OPY-20	AGCCGTGGAA
OPO-01	GGCACGTAAG		OPT-01	GGGCCACTCA		OPZ-01	TCTGTGCCAC
OPO-02	ACGTAGCGTC		OPT-02	GGAGAGACTC		OPZ-02	CCTACGGGGA
OPO-03	CTGTTGCTAC		OPT-03	TCCACTCCTG		OPZ-03	CAGCACCGCA
OPO-04	AAGTCCGCTC		OPT-04	CACAGAGGGA		OPZ-04	AGGCTGTGCT
OPO-05	CCCAGTCACT		OPT-05	GGGTTTGCA		OPZ-05	TCCCATGCTG
OPO-06	CCACGGGAAG		OPT-06	CAAGGGCAGA		OPZ-06	GTGCCGTCA
OPO-07	CAGCACTGAC		OPT-07	GGCAGGCTGT		OPZ-07	CCAGGAGGAC
OPO-08	CCTCCAGTGT		OPT-08	AACGGCGACA		OPZ-08	GGGTGGGTAA
OPO-09	TCCCACGCAA		OPT-09	CACCCCTGAG		OPZ-09	CACCCAGTC
OPO-10	TCAGAGCGCC		OPT-10	CCTTCGGAAG		OPZ-10	CCGACAAACC
OPO-11	GACAGGAGGT		OPT-11	TTCCCCGCGA		OPZ-11	CTCAGTCGCA
OPO-12	CAGTGCTGTG		OPT-12	GGGTGTGTAG		OPZ-12	TCAACGGGAC
OPO-13	GTCAGAGTCC		OPT-13	AGGACTGCCA		OPZ-13	ACTAAGCCC
OPO-14	AGCATGGCTC		OPT-14	AATGCCGCAG		OPZ-14	TCGGAGGTTT
OPO-15	TGGCGTCTTT		OPT-15	GGATGCCACT		OPZ-15	CAGGGCTTTC
OPO-16	TCGGCGGTTT		OPT-16	GGTGAACGCT		OPZ-16	TCCCATCAC
OPO-17	GGCTTATGCC		OPT-17	CCAACGTCGT		OPZ-17	CCTTCCCACT
OPO-18	CTCGCTATCC		OPT-18	GATGCCAGAC		OPZ-18	AGGGTCTGTG
OPO-19	GGTGCACGTT		OPT-19	GTCCGTATGG		OPZ-19	GTGCGAGCAA
OPO-20	ACACACGCTG		OPT-20	GACCAATGCC		OPZ-20	ACTTTGGCGG
OPP-01	GTAGCACTCC		OPV-01	TGACGCATGG		OPP-15	GGAAGCCAAC
OPP-02	TCGGCACGCA		OPV-02	AGTCACTCCC		OPP-16	CCAAGCTGCC
OPP-03	CTGATACGCC		OPV-03	CTCCCTGCAA		OPP-17	TGACCCGCCT
OPP-04	GTGTCTCAGG		OPV-04	CCCCTCACGA		OPP-18	GGCTTGGCCT

<b>Primer neve</b>	<b>Szekvencia</b>		<b>Primer neve</b>	<b>Szekvencia</b>		<b>Primer neve</b>	<b>Szekvencia</b>
OPP-05	CCCCGGTAAC		OPV-05	TCCGAGAGGG		OPP-19	GGGAAGGACA
OPP-06	GTGGGCTGAC		OPV-06	ACGCCCAGGT		OPP-20	GACCCTAGTC
OPP-07	GTCCATGCCA		OPV-07	GAAGCCAGCC		OPV-15	CAGTGCCGGT
OPP-08	ACATCGCCCA		OPV-08	GGACGGCGTT		OPV-16	ACACCCACACA
OPP-09	GTGGTCCGCA		OPV-09	TGTACCCGTC		OPV-17	ACCGGCTTGT
OPP-10	TCCCGCCTAC		OPV-10	GGACCTGCTG		OPV-18	TGGTGGCGTT
OPP-11	AACGCGTCGG		OPV-11	CTCGACAGAG		UPV-19	GGGTGTGCAG
OPP-12	AAGGGCGAGT		OPV-12	ACCCCCCACT		OPV-20	CAGCATGGTC
OPP-13	GGAGTGCCTC		OPV-13	ACCCCTGAA			
OPP-14	CCAGCCGAAC		OPV-14	AGATCCCGCC			

### 8.3 AFLP vizsgálathoz használt PstI és MseI adapterek, preszelektív és szelektív primerek szekvenciája

Primerek/ adapterek neve	Rövidített név	Szekvencia (5'-tól 3' irányban)
MseI adapterek		GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
M00 (szelektív bázis nélküli primer)		GATGAGTCCTGAGTAA
MseI + 3 szelektív bázissal rendelkező primerek	M47	M00 + CAA
	M48	M00 + CAC
	M49	M00 + CAG
	M50	M00 + CAT
	M56	M00 + CGC
	M59	M00 + CTA
	M60	M00 + CTC
	M61	M00 + CTG
	M62	M00 + CTT
	M64	M00 + GAC
	M65	M00 + GAG
	M67	M00 + GCA
	M70	M00 + GCT
	M71	M00 + GGA
	M74	M00 + GGT
PstI adapterek		CTCGTAGACTGCGTACATGCA TGTACGCAGTCTAC
P00 (szelektív bázis nélküli primer)		GACTGCGTACATGCAG
PstI + 3 szelektív bázissal rendelkező primerek	P35	P00 + ACA
	P36	P00 + ACC
	P37	P00 + ACG
	P38	P00 + ACT
	P40	P00 + AGC
	P41	P00 + AGG
	P80	P00 + TAC

## 8.4 RGAP vizsgálathoz használt primerek neve és szekvenciája

Primer neve	Szekvencia (5' – 3')
Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA
Pto kin 2	AGGGGGACCACCACGTAG
RLRR for	CGCAACCACTAGAGTAAC
RLRR rev	ACACTGGTCCATGAGGTT
S2	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
AS3	IAGIGCIAGIGGIAGICC
XLRR for	CCGTTGGACAGGAAGGAG
XLRR rev	CCCATAGACCGGACTGTT
NLRR for	TAGGGCCTCTTGCATCGT
NLRR rev	TATAAAAAGTGCCGGACT
CLRR for	TTTTTCGTGTTCAACGACG
CLRR rev	TAACGTCTATCGACTTCT

## 8.5 A búza 7A kromoszómájának hosszú karjára specifikus SSR primerek

Primer neve	T <sub>m</sub> °C	Primer szekvenciája 5'- 3' orientációban forward	Primer szekvenciája 5'- 3' orientációban reverse
barc029	60	GCACGCAGGAGCACCACCACGAC	GCGAGAGTAAGCAGCACCCGAGGCACGAC
barc049	60	GTCCCACCAAATTAACAGCTCCTA	AGGCGCAGTGTCTCGAAGAATATTAT
barc70	60	GCGAAAAACGATGCGACTCAAAG	GCGCCATATAATTCAGACCCACAAAA
barc108	60	GCGAAATGATTGGCGTTACACCTGTTG	GCGGGTCGTTTCTCGAAATTCATCTAA
barc121	60	ACTGATCAGCAATGTCAACTGAA	CCGGTGTCTTTCCTAACGCTATG
barc195	60	CCCACATGTCATTGGCTGTTTAA	GCCCCGCCCAGAACGATTTAAATG
cfa2019	60	GACGAGCTAACTGCAGACCC	CTCAATCCTGATGCGGAGAT
cfa2040	60	TTCCTGATCCCACCAAACAT	TCAAATGATTTAGGTAACCACTA
cfa2174	60	GGTCTTTGCACTGCTAGCCT	ACGGCATCACAGGTTAAAGG
cfa2240	60	TGCCGCACTTATTTGTTTAC	TGCAGCATGCATTTTAGCTT
cfa2257	60	CCATTATGTAAATGCTTCTGTTTGA	GATACAATAGGTGCCCTCCGC
cfid20	60	TGATGGGAAGGTAATGGGAG	ATCCAGTTCCTCGTCCAAAGC
cfid193	60	GCTGCCGCTACTGTCTGTC	GGCACACTCACACACCACAC
gwm4	55	GCTGATGCATATAATGCTGT	CACTGTCTGTATCACTCTGCT
gwm10	60	CGCACCATCTGTATCATTCTG'	TGGTCGTACCAAAGTATACGG
gwm63	60	TCGACCTGATCGCCCCTA	CGCCCTGGGTGATGAATAGT
gwm130	60	AGCTCTGCTTCACGAGGAAG	CTCCTCTTATATCGCGTCCC
gwm233	50	TCAAAACATAAATGTTTCAATGGA	TCAACCGTGTGTAATTTTGTCC
gwm260	60	GCCCCCTGCACAATC	CGCAGCTACAGGAGGCC
gwm332	60	AGCCAGCAAGTCACCAAAAC	AGTGCTGGAAAGAGTAGTGAAGC
gwm344	60	ATTTGAGTCTGAAGTTTGA	CAAGGAAATAGGCGGTAAC
gwm350	60	ACCTCATCCACATGTTCTACG	GCATGGATAGGACGCC
gwm554	60	TGCCCAACGGAACCTTG	GCAACCACCAAGCACAAAGT
gwm573	50	AAGAGATAACATGCAAGAAA	TTCAAATATGTGGGAAC
gwm635	60	TTCCTCACTGTAAGGGCGTT	CAGCCTTAGCCTTGGCG
gwm666	60	GCACCCACATCTTCGACC	TGCTGCTGGTCTCTGTGC
wmc9	60	AACTAGTCAAATAGTCGTGTCGG	GTCAAGTCATCTGACTTAACCCG
wmc17	60	ACCTGCAAGAAATTAGGAACTC	CTAGTGTTCAAAATATGTCGGA
wmc65	60	TGGATGGGAAGGAGAATAAGTG	ATCCAACCGGAACACTACGTCAG
wmc83	60	TGGAGGAAACACAATGGATGCC	GAGTATCGCCGACGAAAGGGAA
wmc139	60	TGTAAGTGAAGGGCCATGAAT	CATCGACTCACAACACTAGGGT
wmc182	60	GTATCTCACGAGCATAACACAA	GAAAGTGTATGGATCATTAGGC
wmc273	60	AGTTATGTATTCTCTCGAGCCTG	GGTAACCACTAGAGTATGTCCTT
wmc422	60	GGACTACTGAACTGGAGAGTGTG	GCATTAGAATTTGGAGTTGGAG
wmc488	60	AAAGCACAAACAGTTATGCCAC	GAACCATAGTCACATATCACGAGG
wmc525	60	GTTTGACGTGTTTGTGCTTAC	CTACGGATAATGATTGCTGGCT
wmc596	60	TCAGCAACAAACATGCTCGG	CCCGTGTAGGCGGTAGCTCTT
wmc603	60	ACAAACGGTGACAATGCAAGGA	CGCCTCTCTCGTAAGCCTCAAC

<b>Primer neve</b>	<b>T<sub>m</sub> °C</b>	<b>Primer szekvenciája 5'- 3' orientációban forward</b>	<b>Primer szekvenciája 5'- 3' orientációban reverse</b>
wmc607	60	ATATATGCCCATGAAGCTCAAG	GATCGAGCTAAAGCTGATACCA
wmc633	60	ACACCAGCGGGGATATTTGTTAC	GTGCACAAGACATGAGGTGGATT
wmc695	60	GAGGGCACCTCGTAAGTTGG	GGCAGGAGCCCCTACAAGAT
wmc790	60	AATTAAGATAGACCGTCCATATCATCCA	CGACAACGTACGCGCC
wmc809	60	CAGGTCGTAGTTGGTACCCTGAA	TGAACACGGCTGGATGTGA

## 8.6 A búza 5B kromoszómájának rövid karjára specifikus SSR primerek

Primer neve	T <sub>m</sub> °C	Primer szekvenciája 5'- 3' orientációban forward	Primer szekvenciája 5'- 3' orientációban reverse
barc4	50	GCGTGTTTGTGTCTGCGTTCTA	CACCACACATGCCACCTTCTTT
barc21	50	GCGTCTTCCGGTTTTGTTTACTTTTC	GCGTTAGGGCTATGGCGGTGTG
barc32	50	TGGAGAACCTTCGCATTGTGCATTA	GCGTGAATCCGGAAACCAATCTGTG
barc89	60	CTCCGAGGCCACCGAAGACAAGATG	GGGCGCGGCACCAGCACTACC
barc109	50	GGCAAAAGAGAAGGCTCGGAAGAACC	CGCATCGACGTAACATCACCACAATCATT
barc216	50	GGTGATTATTCGTGAGTTCCCTGTG	TGACGACCCAATCCATAGACA
barc240	50	AGAGGACGCTGAGAAGTTTAGAGAA	GCGATCTTTGTAATGCATGGTGAAC
cfa2070	60	TTACTGGCAAGCCAGAAGTGT	TCTGAACCCCTGATTTTCCG
cfa2121.1	60	TAAATGGCCATCAAGCAATG	GCTTGTGAACTAATGCCTCCC
cfd5	60	TGCCCTGTCCACAGTGAAG	TTGCCAGTCCAAGGAGAAT
cfd20	60	TGATGGGAAGGTAATGGGAG	ATCCAGTTCTCGTCCAAAGC
cfd60	60	TGACCGGCATTACAGTATCAA	TGGTCACTTTGATGAGCAGG
cfd156	60	AGCAGTGTAAATAAAGGGCG	GTATTCGCACCAGAATCCGT
cfd219	60	GGCCCATCTGTCAATGACTT	CAGCTTGTGTGCTCGCTTA
Gdm146	60	ATCCTGACGGCCACCAC	CAAAGCCTGCGATACATCAA
gwm 66	60	CATGACTAGCTAGGGTGTGACA	CCAAAGACTGCCATCTTTCA
gwm67	60	ACCACACAAACAAGGTAAGCG	CAACCCTCTTAATTTTGTGGG
gwm68	60	CTCCCTAGATGGGAGAAGGG	AGGCCAGAATCTGGGAATG
gwm118	50	GATGTTGCCACTTGAGCATG	GATTAGTCAAATGGAACACCCC
gwm133	60	ATCTAAACAAGACGGCGGTG	ATCTGTGACAACCGGTGAGA
gwm156	60	CCAACCGTGCTATTAGTCATTC	CAATGCAGGCCCTCCTAAC
gwm159	60	GCAGAAGCTTGTTGGTAGGC	GGGCCAACACTGGAACAC
gwm191	60	AGACTGTTGTTTGC GGCC	TAGCACGACAGTTGTATGCATG
gwm213	60	TGCCTGGCTCGTTCTATCTC	CTAGCTTAGCACTGTGCCCC
gwm234	50	GAGTCCTGATGTGAAGCTGTTG	CTCATTGGGGTGTGTACGTG
gwm274	50	AACTTGCAAAAAGTTCCTGA	TATTTGAAGCGGTTTGATTT
gwm293	55	TCGCCATCACTCGTTCAAG	TACTGGTTCACATTGGTGCG
gwm335	55	CGTACTCCACTCCACACGG	CGGTCCAAGTGCTACCTTC
gwm415	55	GATCTCCCATGTCCGCC	CGACAGTCGTCACTTGCCTA
gwm443	55	GGGTCTTCATCCGGAAGTCT	CCATGATTTATAAATCCACC
gwm540	55	TCTCGCTGTGAAATCCTATTTTC	AGGCATGGATAGAGGGGGC
gwm544	55	AGGATTCCAATCCTTCAAATTT	TAGAATTCCTTATGGGGTCTGC
wmc47	65	GAAACAGGGTTAACCATGCCAA	ATGGTGCTGCCAACACATACA
wmc73	65	TTGTGCACCGCACTTACGTCTC	ACACCCGGTCTCCGATCCTTAG
wmc149	65	ATGGGCGGGGTGTAGAGTTTG	ACAGACTTGGTTGGTGCCGAGC
wmc274	60	AAGCAAGCAGCAAACTATCAA	GAATGAATGAATGAATCGAGGC
wmc363	60	TCTGTAACGCATAATAGAATAGCCC	ATGATTGCGTTATCTTCATATTGG
wmc376	60	TCTCAACCACCGACTTGTA	ACATGTAATTGGGGACTG

wmc386	65	ATCACTGAAACGAAATGAGCGG	TGGTTGGCGGTTTTCTCTACA
wmc616	60	TAAAGCTAGGAGATCAGAGGCG	TAATCCCATCTTGAGAAGCGTC
wmc630	60	ATAATGCACGGTAGGACTGAGG	CATACTGAGACAATTTGGGGGT
wmc728	60	GCAGGCTCTGCATCTTCTTG	CGCAGAGCTGAGCTGAAATC
wmc773	60	GAGGCTTGCATGTGCTTGA	GCCAACTGCAACCGGTACTCT



## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek Dr. Purnhauser Lászlónak a munkafeltételek biztosításáért, szakmai támogatásáért és hasznos tanácsaiért.

Hálával tartozom Dr. Matuz János igazgató úrnak és a Gabonakutató Kft. minden dolgozójának tanulmányaim szakmai és erkölcsi támogatásáért.

Külön köszönettel tartozom Csósz Lászlóné Dr. Gyuris Máriának a fenotípusos vizsgálatok elvégzésében nyújtott szakmai tanácsaiért, valamint azért, hogy rendelkezésemre bocsátotta az általa előállított levélrozda monospórák izolátumokat. Köszönöm a dolgozat javításához adott tanácsait, szakmai segítségét.

Köszönetemet fejezem ki továbbá Pusztai Lászlóné† és Nagyhaska Editnek, hogy hasznos technikai tanácsaikkal segítettek a fenotipizálási munkákat valamint köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Lajtár Tímeának, Selyemné Frank Szilviának, Fónad Péternének a laboratóriumi munkában és Becsey Magdolnának a szántóföldi és üvegházi munkában nyújtott segítségét.

Hálásan köszönöm Búza Lajosnának és Fejes Erzsébetnek az angol nyelvű fordításban nyújtott segítséget és Kocsis Zoltán pályázati referensnek a dolgozat formai szerkesztésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Kertész Zoltánnak, hogy az általa vezetett, doktoranduszok foglalkoztatására és munkájuk támogatására elnyert pályázat (OTKA TS 40887) egyik résztvevője lehettem. Köszönöm Prof. Dudits Dénes, akadémikus úrnak a kutatási részvételt az általa vezetett két konzorciumban (NKFP\_4/023/2001; KPI\_4/064/2004).

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Családomnak, hogy szeretetükkel támogattak, és biztosították a munkához nélkülözhetetlen nyugodt környezetet.