

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**Búza fuzárium rezisztenciával kapcsolt QTL-ek és
rezisztenciagén analógok vizsgálata GK Mini Manó/Frontana
DH populációban**



György Andrea

Biológus MSc II. évfolyam

**Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar –
Növénybiológiai Tanszék**

Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Szeged

Témavezetők:

Szabó-Hevér Ágnes

Prof. Dr. Mesterházy Ákos

Konzulens:

Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolán

Szeged

2012

Tartalmi összefoglaló

A kalászfuzáriózis a kalászos gabonáink – köztük a búza (*Triticum aestivum* L.) – egyik legsúlyosabb károkat okozó betegsége.

Munkánk során, a Frontana brazil tavaszi búzafajta fuzárium rezisztenciájának molekuláris hátterét vizsgáltuk. A legtöbb Frontana rezisztenciájának hátteréről szóló közleményben bizonyítottan fuzárium rezisztenciával kapcsolt QTL-t (quantitative trait locus, mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókus) hordozó 3A, 5A és 6B kromoszómák térképezését végeztük el a GK Mini Manó/Frontana dihaploid (DH) térképező populációban, SSR (simple sequence repeat, mikroszatellit) és DArT (diversity arrays technology) markerek segítségével. A növényi anyagot két kísérleti év során összesen hat epidémiái szituációban teszteltük *Fusarium culmorum* és *Fusarium graminearum* izolátumokkal szántóföldön. A fuzárium rezisztencia mértékének jellemzésére kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség és dezoxinivalenol (DON) tartalmat is vizsgáltunk.

A QTL térképezés mellett elvégeztük különböző rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markerek meghatározására használt, rezisztenciagén analóg (RGA) primerek tesztelését a két szülőn, és a populáció hét fogékony és hét rezisztens vonalán.

A vizsgált három kromoszómán öt QTL régiót sikerült azonosítani. Az 5A és 6B kromoszómán található két QTL mutatott kapcsoltságot kalászfertőzöttséggel, szemfertőzöttséggel és DON tartalommal is. Ugyanezek a kromoszómák további két olyan QTL-t azonosítottunk, amely csak DON tartalommal volt összefüggésben, míg kalász- és szemfertőzöttséggel nem, vagy csak gyenge kapcsoltságot mutatott. Térképezési munkánk során, a 3A kromoszómán korábban leírt Frontana eredetű QTL jelenlétét sikerült bebizonyítanunk, ám ez utóbbi QTL csak a DON tartalommal mutatott következetes kapcsoltságot. A Frontana fuzárium rezisztenciájának molekuláris hátterének pontosabb megértéséhez a RGA primerektől várunk további segítséget.

Kulcsfogalmak: búza (*Triticum aestivum* L.), fuzárium rezisztencia, QTL térképezés, SSR, DArT, *F. culmorum*, *F. graminearum*, kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség, dezoxinivalenol (DON), rezisztenciagén analóg (RGA).

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	1
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. A búza fuzáriózisának jelentősége	5
2.2. A kórokozó életmódja	5
2.3. Védekezési lehetőségek.....	6
2.4. Fuzárium rezisztencia	7
2.5. Molekuláris markerek	9
2.6. Genetikai térképezés	11
2.7. Markerekkel támogatott szelekció (MAS)	14
2.8. A térképezési munkánk előzményei.....	15
2.9. Rezisztenciagén analógok (RGAs)	16
3. Célkitűzés.....	17
4. Anyag és módszer.....	18
4.1. Növényi anyag.....	18
4.2. Szántóföldi kísérletek	18
4.2.1. Szántóföldi elrendezés.....	18
4.2.2. Inokulum készítés és fertőzés	18
4.2.3. A fertőzöttség súlyosságának felmérése.....	19
4.3. Laboratóriumi vizsgálatok	20
4.3.1. Deoxinivalenol (DON) akkumuláció vizsgálata.....	20
4.3.2. Genomi DNS kivonása	21
4.3.3. A QTL térképezéshez használt molekuláris markerek vizsgálata	21
4.3.4. Rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok	21
4.4. Statisztikai analízis	22
4.4.1. A kalászfuzáriózis rezisztenciát jellemző tulajdonságok statisztikai elemzése.....	22
4.4.2. QTL analízis.....	22
5. Eredmények.....	24
5.1. A kalászfuzáriózis rezisztenciát jellemző tulajdonságok statisztikai elemzése	24

5.2. QTL térképezés.....	27
5.2.1. Kalászfertőzöttséggel kapcsolt QTL-ek:	27
5.2.2. Szemfertőzöttséggel kapcsolt QTL-ek:	27
5.2.3. DON tartalommal kapcsolt QTL-ek:	28
5.3. Rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok	28
6. Eredmények értékelése.....	31
6.1. QTL térképezés eredményei.....	31
6.2. Rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok	32
7. Összegzés.....	33
8. Irodalomjegyzék.....	34
Köszönetnyilvánítás	45
Nyilatkozat.....	46
Függelék.....	47

1. Bevezetés

A *Fusarium* nemzetség különböző fajai a legtöbb termesztett gabonafélében okoznak problémát. Csírapusztulást, szár- és gyökérrothadást, valamint súlyos kalászbetegséget idéznek elő. A búza kalászfuzáriózis betegségének jelentőségét már a XIX. század végén leírták (Chester, 1890; Arthur, 1891). A korai beszámolók óta a világ legtöbb búzatermesztő régiójában feljegyezték a betegséget, ami legalább 17 fuzárium fajjal kapcsolatba hozható. A különböző feljegyzések akár 40-70 %-os terméshozam-kiesést írnak le a betegség kapcsán (Parry és mtsai, 1995).

Magyarországon Kükedi (1972) 40-50 %-os, súlyos kalászfuzáriózis fertőzésnek tulajdonítható termésvesztésről számolt be az 1970-es évben. Száraz években 5-6 % a belső fertőzöttséget mutató szemek országos aránya. A gombafertőzés számára kedvező környezeti feltételek mellett azonban ez 20 % fölött is lehet. Az átlagosnál csapadékosabb 2010-es évben a belső fertőzöttséget mutató őszi búza magvak országos aránya 24,6 %-ra volt tehető (Halász és Valovics, 2012).

A betegséggel szembeni vegyszeres és agrotechnikai védekezés mellett hosszútávon a leghatékonyabb és legkörnyezetkímélőbb védekezési mód a rezisztencianemesítés, azaz a nagyobb ellenállóképességű fajták létrehozása. A nemesítő programok különböző, a betegséggel szemben magas ellenállóképességet mutató búzafajtákkal, ún. rezisztenciaforrások bevonásával próbálják a rezisztenciát növelni.

A különböző rezisztenciaforrások azonosítása, és a rezisztenciát kialakító genetikai faktorok megértése nagyban segíti a nemesítő programok munkáját, és lehetővé teszi a hagyományos fenotípusos szelekció mellett a markerekkel támogatott szekció (MAS) alkalmazását a fuzárium rezisztencianemesítésben.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A búza fuzáriózisának jelentősége

A kalászfuzáriózis a gazdasági szempontból fontos kalászos gabonáink, köztük a búza (*Triticum aestivum* L.), egyik legjelentősebb károkat okozó betegsége. Sok különböző *Fusarium* faj hozható összefüggésbe a betegséggel, ezek közül azonban az éghajlati viszonyoktól függően a *Fusarium graminearum* (ivaros forma *Gibberella zeae*), *Fusarium culmorum* és a *Fusarium avenaceum* (ivaros forma *Gibberella avenaceae*) tekinthetők a legjelentősebb kórokozóknak (Parry és mtsai, 1995). A kalászfuzáriózis károsítja a keményítő szemcséket és a sejtfalet, továbbá magvak szerkezetének romlásához és tömegük csökkenéséhez, ezzel terméshozam-kieséshez és minőség romláshoz vezet. A *F. graminearum* és *F. culmorum* fajok trichotecéneket termelnek, 3-acetil-dezoxinivalenolt (3A-DON), nivalenolt (NIV), és legnagyobb mennyiségben dezoxinivalenolt (DON) (Gang és mtsai, 1998; Bottalico és Perrone, 2002). Ezek a mikotoxinok eukariótákban képesek a fehérjeszintézis gátlására (McLaughlin és mtsai, 1977) és fitotoxikus hatásúak. A mikotoxinok felhalmozódása a szemekben a terméshozam-kiesés mellett komoly ételminőség-egészségügyi problémákat okozhat. Ezek kockázatának minimálisra csökkentése érdekében több országban, köztük az Európai Unió tagállamaiban is határértékeket vezettek be, megszabva az emberi fogyasztásra készült ételek alapanyagainak és a készételeknek a maximális fuzárium toxin tartalmát (Európai Tanács 2005, 2007), és az állati takarmányokra vonatkozóan is ajánlást tettek (Európai Tanács 2006).

2.2. A kórokozó életmódja

A *Fusarium* nemzetség rendszertanilag az *Ascomicota* törzs, *Hypocreales* rend, *Hypocreaceae* családjába tartozik. A kalászfuzáriózist okozó *Fusarium* fajok fitopatogén, nekrotróf gombák. A fuzárium fajok különböznek az éghajlati eloszlásukban és a fertőzéshez szükséges optimális éghajlati tényezők szempontjából is, de a legtöbb faj számára a meleg és nedves környezet ideális az intenzív növekedéshez (Doohan és mtsai, 2003). A fertőzés terjedhet mind ivartalan spórákkal, mind pedig ivaros aszkospórával, melyek széllel, vízcsepp felcsapódásával terjedhetnek leginkább (Parry és mtsai, 1995). A gomba fertőzhet a pelyvába, toklászba és a kalászszorsóba közvetlenül behatolva. Fogékony búzában a kórokozó a szállítószöveteken keresztül több kalászkát is képes megfertőzni. A

talajon és a felszínén lévő növény maradványokon előforduló peritéciumokból származó aszkospórák, ivartalan spórák és hifa darabok a fertőző inokulum fő forrásai (Kosová és mtsai, 2009).

A betegség tünetei a legtöbb a gabonafélén hasonlóak. Az első tünetek általában kis foltok, elszíneződések a virág pelyváján egy kalászkán. A betegség előrehaladtával ez a kalászorsóra, majd az egész kalászra áttérjedhet. A foltok először világos színűek, majd később narancsszínűek, rózsaszínűek, vörösek vagy cserszínűek lesznek (Kosová és mtsai, 2009), a betegség hatására a fertőzött magvak töppedtek, krétapor-szerű fehér vagy világos rózsaszínű elszíneződést mutatnak (Abramson és mtsai, 1987).

2.3. Védekezési lehetőségek

A kalászfuzáriózissal szembeni védekezést három alapvető csoportra lehet osztani: agrotechnikai, vegyszeres és genetikai védelem.

Az agrotechnikai védelem alatt azt értjük, hogy az agrotechnika minden elemét úgy választjuk meg, hogy azok minél egészségesebb növényállomány kialakítását segítsék (Békési 2010). Mivel alapvető fertőzési források az előző évben megbetegedett növények maradványai, ezért kívánatos, hogy búzát búza után ne vessenek, illetve kukorica után sem, mivel sok fuzárium fajnak a kukorica is gazdanövénye. Ez előbbi okok miatt előnyösebb a fuzárium fajok ellen való védekezés szempontjából az ún. forgatásos talajművelés, amely az előző évi tarlómaradványok leforgatását biztosítja. Fontos tényező továbbá a növény tápanyag ellátottsága. A nitrogén szerepe azonban nem teljesen tisztázott. Vannak olyan tanulmányok, amelyek szerint a megemelkedett nitrogén szint kedvez a betegség kifejeződésének (Martin és mtsai, 1991), más tanulmányok nem tudtak összefüggést kimutatni a két tényező között (Teich és Hamilton 1985; Fauzi és Paulitz 1994). Azonban Teich és Nelson (1984) kísérleteik alapján úgy találták, hogy a nitrogén szint emelése csökkentette a kalászfuzáriózis kialakulását. Az időben való betakarítás is fontos, hiszen a beérett és időben be nem takarított búza, ha a tartósan csapadékos idő miatt késve kerül betakarításra, úgy nagy mértékben ki van téve a további fertőzésnek és a toxinok felszaporodásának. A betakarított termés megfelelő tisztítás, 14 % alatti nedvességtartalommal történő betárolása, és a tárolótér megfelelő szellőztetése csökkenti a toxinképződés veszélyét (Békési 2010).

A vegyszeres védekezés alatt kalászfuzáriózis esetén főként az állomány fungiciddal való kezelését kell érteni. Teljes kikalászolástól érdemes a vegyszerek alkalmazása.

Számos engedélyezett szer van, hatóanyagukat tekintve többnyire különböző *azolok*. A kalászfuzáriózissal szembeni állományvédelem hatékonysága viszonylag gyengének mondható. A nemzetközi irodalomban 20-30 % az átlag (bár ez messze nem elégséges). Természetesen amerikai adatokban is ritkán vannak 70 %-ot meghaladó értékek. Azonban a vegyszerek ennél lényegesen jobbak, a szegedi adatok már hosszú évek óta 80 % feletti értékeket adnak a legjobb fungicidekre, és ez szántóföldön is konzekvensen reprodukálható (Mesterházy, 2003; Lehoczki-Krsjak és mtsai, 2010).

Hosszútávon a védekezés legolcsóbb és legkörnyezetkímélőbb módja a fajtákban kialakított ellenállóság, vagyis a genetikai védelem. A fuzárium rezisztencia mennyiségi tulajdonság, tehát nem egy-két főgén hatása alakítja ki. Az átlagosnál jóval kisebb mértékű fogékonyság is hatékony védekezési lehetőséget nyújt a betegséggel szemben (Békési 2010).

2.4. Fuzárium rezisztencia

A mennyiségi tulajdonságokra, így a fuzárium rezisztenciára is, az a jellemző, hogy nagyszámú egyeden vizsgálva nem jól elkülönülő fenotípusokban, hanem folytonos eloszlásban jelennek meg. A környezeti tényezők, de nagyszámú egyéb tulajdonság is befolyásolhatja a kifejeződésüket. Több, mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókuszt (QTL) alakítja ki őket. QTL-ek alatt egy kromoszóma viszonylag szűk régióját értjük, azonban ez több gént is magába foglalhat. Vannak nagy (major), közepes (medium) és kis (minor) hatású QTL-ek is. A csoportosítás alapja az, hogy az adott QTL a fenotípusos varianciát milyen mértékben határozza meg (Collard és mtsai, 2005).

Búzában a kalászfuzáriózis rezisztencia horizontálisnak tekinthető, hiszen nincsen bizonyíték arra, hogy *F. culmorum* vagy *F. graminearum* fajták különböző búza genotípusokhoz adaptálódtak volna. (Mesterházy, 1977; Snijders és mtsai, 1991; Eeuwijk és mtsai, 1995; Mesterházy, 2002a; Hollins és mtsai, 2003).

A fuzárium rezisztenciának több típusát különböztetjük meg. Schroeder és Christensen (1963) két, eltérő típusú rezisztenciát írt le:

- A gomba elsődleges behatolásával szembeni rezisztencia (I. típus).
- A gomba kalászban való terjedésével szembeni rezisztencia (II. típus).

A két forma közötti különbség a szerzők szerint az, hogy az egyik (I.) a permetezéses inokuláció, a másik (II.) pedig az egyvirág inokulációs fertőzés eredményeként értelmezendő.

Miller és Arnison (1986) felismerte a mikotoxin akkumulációval szemben rezisztenciát, amely nem mutat korrelációt az I. és II. típussal. Mesterházy (1995, 2002b) a következők szerint csoportosítja a fuzárium rezisztencia típusait:

- I. A gomba elsődleges behatolásával szembeni rezisztencia.
- II. A gomba kalászban való terjedésével szembeni rezisztencia.
- III. Szemfertőzőttséggel szembeni rezisztencia.
- IV. Tolerancia. (Ugyanakkora kalászfertőzőttségnél kisebb termésveszteség figyelhető meg a toleráns növénynél.)
- V. Toxin akkumulációval szembeni rezisztencia. Boutigny és mtsai (2008) ezt a rezisztencia típust két altípusra osztotta:
 - V-1. Az akkumulációt a mikotoxin lebontása vagy detoxifikálása akadályozza meg.
 - V-2. Az akkumulációt a mikotoxin bioszintézisének gátlása akadályozza meg.
- VI. Késői fertőzéssel szembeni rezisztencia. (Alacsony szemfertőződés az érés folyamán hosszú esős periódus esetén.)
- VII. Kalászvég elhalása. (A fertőződési pont feletti kalászcsoecs elhalása.)

Azt is több tanulmány alátámasztja, hogy a kalászfuzáriózis rezisztencia (főként az I. és II. típus) összefüggést mutat különböző morfológiai jellegeket meghatározó allélokkal, különösen a növénymagassággal és a kalácsolási időponttal (Parry és mtsai, 1995), szálkassággal, kalásztömöttséggel (Mesterházy, 1987), virág felépítéssel és virágzással kapcsolatos jellegekkel, mint a szűk virágpelyva nyílás (Gilsinger és mtsai, 2005), vagy a portok kilógása (Taylor, 2004). Amikor a rezisztencia összefüggést mutat a növény fiziológiai és morfológiai jellemzőivel, azt passzív rezisztenciának is nevezzük (Mesterházy, 1995).

Rezisztenciaforrásnak nevezzük azokat a búza fajtákat, amelyek magas ellenállóképességet mutatnak a kalászfuzáriózissal szemben. A legmagasabb ellenállóképességű fajták a távol-keleti régióból származnak. Ebből a régióból származik a II. típusú rezisztenciaforrásként az egész világon jól ismert kínai Sumai 3 tavaszi búzafajta, és további magas ellenállóképességű fajták, mint a kínai Ning 7840 és Ning 894037 (Shen és mtsai, 2003; Zhou és mtsai, 2003), a Whangshuibai (Zhang és mtsai, 2004; Mardi és mtsai, 2005; Ma és mtsai, 2006a) és Wuhan, továbbá a japán Nyu Bai (Somers és mtsai, 2003) és Nobeokabozu komugi, és a koreai Chokwang (Yang és mtsai, 2005) fajták.

Az Európából származó források közül kiemelkedő rezisztenciával rendelkeznek a kelet-európai a Praag 8 és a Novokrumka 0102 őszi búzák (Snijders 2004). Illetve vannak

ígéretes mérsékelt rezisztenciával rendelkező források is, például a francia Renan (Gervais és mtsai, 2003), a német Cansas, Dream és Petrus (Klahr és mtsai, 2007) és a svájci Arina (Paillard és mtsai, 2004) fajták. A szegedi fajták közül például a GK Csillag, a GK Fény és a GK Rozi rendelkezik az átlagost jóval meghaladó ellenállóképességgel.

Az észak-amerikai források közül az Ernie puha- vörös szemű őszi búzafajta (Liu és mtsai, 2005, 2007) és a Heyne (Zhang és mtsai, 2012) őszi búza az, ami ígéretes kalászfuzárium rezisztencia QTL forrásnak tűnik. A dél-amerikai források közül jelentős brazil Frontana tavaszi búza, amely leginkább I. típusú rezisztenciaforrásként ismert (Steiner és mtsai, 2004).

2.5. Molekuláris markerek

A QTL-ek azonosítása csupán fenotípusos jellegek vizsgálatával nem lehetséges. A mennyiségi jellegek jellemzésében a nagy áttörést a különböző DNS markerek kifejlesztése hozta.

A genetikai markereknek genetikai különbségeket reprezentálnak fajok vagy egyes élőlények között. Három fő típus ismert:

1. Morfológiai (klasszikus vagy látható) markerek: fenotípusos jellegek vagy tulajdonságok.
2. Biokémiai markerek: ide tartoznak enzimek különböző allél változatai (izoenzimek).
3. DNS (vagy molekuláris) markerek (Jones és mtsai, 1997).

A fő probléma a morfológia és biokémiai markerekkel az, hogy a számuk véges és hogy a környezeti tényezők, valamint a növény fejlődési állapota befolyásolhatja őket (Winter és Khal, 1995). A molekuláris markerek nukleotid szintű variációk. A kromoszómákon meghatározható hellyel rendelkeznek, öröklődésük a mendeli szabályokat követi. A marker lehet gén is, de általában ismeretlen funkciójú DNS szakasz, a fenotípusos jelleg meghatározásában részt nem vevő, semleges allélokat hordoz (Kiss, 2005). Ezek a nukleotid (DNS) variációk különböző DNS mutációból származnak: szubsztitúciós mutációk (pont mutáció), átrendeződések (inszerció vagy delécio), vagy az ismétlődő DNS szekvenciák replikációjának hibájából bekövetkező mutációk (Paterson, 1996). A morfológiai és biokémiai markerekkel szemben számuk gyakorlatilag végtelen, és nem befolyásolja őket a környezet és a növény fejlődési állapota (Winter és Khal, 1995).

A DNS markereket három nagy csoportra lehet osztani a kimutatásukra használt módszer alapján:

1. Hibridizáción alapuló. Pl. RFLP (restriction fragment length polymorphism), DArT (diversity arrays technology).
2. Polimeráz láncreakción (PCR) alapuló. Pl. AFLP (amplified fragment length polymorphism), RAPD (random amplification of polymorphic DNA) és SSR (simple sequence repeat).
3. DNS szekvencia különbségen alapuló. Pl. SNP (single-nucleotide polymorphism) (Collard és mtsai, 2005).

A DNS szekvencia különbségen alapuló markerek használata, az előző kettővel ellentétben, mindenképpen előzetes szekvencia ismeretet igényel (Kiss, 2005). Egy DNS marker akkor használható, ha különbségeket mutatnak fajok egyedei vagy fajok között. Az ilyeneket polimorf, a genotípusok között különbséget nem mutatókat monomorf markereknek nevezzük. A polimorf markerek lehetnek dominánsak és kodominánsak aszerint, hogy a markerrel meg tudjuk-e különböztetni a homozigótákat és a heterozigótákat. A kodomináns markerek méretbeli különbségeket mutatnak, míg a domináns markerek vagy megjelennek, vagy nem jelennek meg (Collard és mtsai, 2005).

A mikroszatellit vagy SSR (simple sequence repeat) markerek PCR alapú, kodomináns markerek. A növényi genomra jellemző, hogy fajtól függően 10-90 %, de akár 90 %-ot is meghaladó mértékben, rövid ismétlődő DNS motívumokat tartalmaz. Ezek az ismétlődések a genomban egyenletesen oszlanak el. A mikroszatellit motívumok száma eltérő, a határszekvenciákra tervezett primerpárokkal eltérő méretű fragmentumokat lehet felszaporítani. A változatosság forrása a repetitív szekvenciák replikációja során bekövetkező csúszás (Kiss, 2005). A hossz-polimorfizmus kimutatható gélelektroforézissel és az azt követő festéssel (etídium-bromid, ezüst).

A DArT-ot (diversity arrays technology) egy hibridizáción alapuló lehetőségként fejlesztették ki. Azt, hogy ez a technológia jól használható a hexaploid búzában, Akbari és mtsai (2006) valamint Semagn és mtsai (2006) munkája is alátámasztja. Ez egy nagy áteresztőképességű módszer, ami az egyedi DNS fragmentumok meglétét detektálja a „komplexitás csökkentéssel” a genomi DNS-ből előállított „genomi reprezentációban” (Jaccoud és mtsai, 2001). A „komplexitás csökkentést” végezhetik restrikciós enzimes hasítással, majd adapterek ligálásával, azt követően amplifikációval (Wenzl és mtsai, 2004). A „genomi reprezentáció” egyéb módszerekkel is készíthető.

A DArT marker vizsgálatok alapja, hogy a „genomi reprezentációban” két típusú fragmentumot találunk:

- Állandó fragmentumok, amelyek minden „reprezentációban” megtalálhatóak, amit az adott fajhoz tartozó genotípusokból származó DNS-ből készítettek.
- Változó (polimorf) fragmentumok, amelyek nem minden „reprezentációban” találhatók meg.

A változó fragmentumok azért informatívak, mert szekvencia variációt tükröznek, ami meghatározza az eredeti DNS minta azon részét, amit a „reprezentáció” tartalmaz. A változó fragmentumokat nevezzük DArT markereknek. Ezek jelenlétének vagy hiányának vizsgálata a genomi „reprezentációban”, a „reprezentáció” egy DArT sorhoz való hibridizációjával történik, amely az adott faj DNS könyvtárát tartalmazza. A könyvtárkészítéshez különböző egyedektől származó „genomi reprezentációk” keverékét szaporítják fel, amelyek így lefedik a faj teljes genetikai változatosságát. A hibridizációt microarray platformon végzik. Az egyedi „reprezentációk” egy fluoreszcens festékkel vannak jelölve, míg a könyvtárkészítésnél használt vektor fragmentumokat egy másik fluoreszcens festékkel jelölik, amelyek referenciaként szolgálnak, így hibridizáltatják őket a próbához. Minden egyedi „reprezentáció”, csak a próba vele összeillő fragmentumaival fog hibridizálni, így az egyes „reprezentációk” esetén egyedi hibridizációs mintázatot kapunk. Az adatok elemzése számítógépes program használatával történik (www.diversityarrays.com).

2.6. Genetikai térképezés

Mind a mendeli gének, mind a mennyiségi tulajdonságokat meghatározó QTL-ek azonosításához térképezési populációkra van szükség (Kiss, 2005). A klasszikus térképezési megközelítéseknel hasadó, azaz szegregáló populációkat használnak, amelyek két különböző tulajdonságú szülő keresztezéséből származnak. Fuzárium rezisztencia térképezés esetén egy rezisztens és egy fogékony szülő keresztezéséből származó populációról van szó. Gyakran használt populáció típusok:

- RIL (recombinant inbred lines): rekombináns beltenyésztett vonalak.
- BC (backcross): visszakeresztezésből származó hasadó populációk.
- DH (doubled haploid): dihaploid, teljesen homozigóta vonalak (Buerstmayr és mtsai, 2009).

A RIL-eket egy mag módszerrel (single seed descent) hozzák létre, 6-8 generáción keresztül történő önbeporzással, melynek a végére gyakorlatilag homozigóta vonalakat kapnak (Kiss, 2005).

A DH populációk előállítása gyors, hiszen egy generáció alatt a különböző lókuszokban homozigóta vonalakat kapunk. A dihaploid vonalakat az F_1 nemzedék haploid gamétáiból származó kromoszómák megduplázásával állítják elő. Ez történhet mikrospóra-tenyésztés, portoktenyésztés vagy ginogenezis alapú növényregenerálási rendszer segítségével (Kiss, 2005). Térképező munkára ez a legjobb, mert itt már stabil törzsekről van szó, amelyekkel korlátlan ideig lehet dolgozni a változás legkisebb kockázata nélkül.

A fuzárium rezisztencia QTL-ek térképezésének elvégzéséhez szükséges fenotipizáláshoz mesterségesen kell inokulálni a populációt. A kalászfuzáriózis járvány súlyossága több tényezőtől függ:

- A gazdanövény és a patogén genetikai faktoraitól (rezisztenciafaktorok a növényben és a gomba agresszivitása).
- A környezet hatása a gomba megtelepedésére és a betegség kifejeződésére, ami szignifikáns genotípus x környezet (GxE) kölcsönhatást alakíthat ki (Campbell és Lipps, 1998; Fuentes és mtsai, 2005), ami jelentősen elferdítheti a QTL becsléseket (Ma és mtsai, 2006b).

A fenti tényezőkből kifolyólag a legtöbb fuzárium rezisztencia tanulmányban mesterséges inokulációt alkalmaznak, ugyanazzal az inokulummal, ugyanabban a fejlődési szakaszban (pl. virágzás közepe), hogy minél inkább hasonló feltételek között tudják tesztelni a populációt (Buerstmayr és mtsai, 2009). A fertőzésre több módszert alkalmazhatnak:

- Mesterségesen fertőzött gabonaszemek (búza, árpa vagy kukorica) kiszórásával biztosítják a fertőzőanyag forrást.
- Egyvirág inokulációs módszer: a kalász közepén levő kalászká egyik virágjának belsejébe juttatnak egy csepp konídium szuszpenziót, majd a fertőzés terjedését mérik.
- Permetezési módszer: a kalászok teljes felületének konídium vagy/és micélium szuszpenzióval történő permetezése.

A permetezés esetén több módszer alkalmazható:

- A vizsgálandó növények egészét a virágzás alatt minden harmadik-negyedik napon fertőző anyaggal permetezik. Ez a módszer a késői érésű genotípusokat

részesíti előnyben, mivel azok sokkal kevesebb fertőző anyagot és nedvességet kapnak.

- A virágzási időnek megfelelően csak egyszer fertőzik a különböző genotípusokat.

Mindkét módszernél párasító öntözést kapnak a növények, ebből az következik, hogy a második módszer alkalmazásánál is a korai virágzású genotípusok tovább kapják ezt a párasító öntözést, mint a kései virágzásúak. Ezért szerencsésebb a Mesterházy (1987) által kidolgozott módszer, melynek során kalász csokrok genotípusonkénti egyszeri fertőzését egy 48 órás polietilén zacskós takarás követ.

Általánosan elfogadott, hogy a permetezéssel a I. és II. típusú rezisztencia vizsgálható (Buerstmayr és mtsai, 2009). Azonban a különböző permetezési módszerek alkalmazása minden rezisztencia típus vizsgálatához használható, nem csak az I. és II., de a szemfertőzöttséggel szembeni, a DON akkumulációval szembeni rezisztencia, és a tolerancia is vizsgálható (Mesterházy, 1995). Ezért a permetezéssel inokuláció nemesítési, kutatási célokra megfelelőbb lehet (Mesterházy, 1995; Miedaner és mtsai, 2003).

Draeger és mtsai (2007) és Lu és mtsai (2011) vizsgálatai is alátámasztják, hogy a téves QTL detektálás elkerülésének érdekében elengedhetetlen a populációt több különböző környezetben vizsgálni. Kis számú kísérleti járványhelyzet (2-3) alkalmazásával – főleg szántóföldi kísérleteknél – az adatok kevésbé megbízhatóak, mintha több kísérleti környezetet alkalmaznának, ami téves QTL analízishez vezethet (Szabó-Hevér és mtsai, 2012).

Buerstmayr és mtsai (2009) összefoglalója szerint a legtöbb vizsgálatnál a fuzárium fertőzés súlyosságának jellemzésére a kalászfertőzöttség (FHB – *Fusarium* head blight, kalászfuzáriózis; AUDPC – area under disease progress curve, járványgörbe alatti terület) tüneteket használják, emellett vannak tanulmányok, amelyeknél toxin, főleg DON akkumulációs, illetve szemfertőzöttség (FDK – *Fusarium*-damaged kernels) adatokat (Yang és mtsai, 2005; Li és mtsai, 2008; Szabó-Hevér és mtsai, 2012) is használtak. Több fuzárium rezisztencia típus vizsgálata ajánlott a fenotipizálás során. Ennek hátterében az áll, hogy azok a markerek, amelyek több rezisztencia típussal is kapcsolatosak, nagyobb eséllyel jeleznek egy valódi, molekuláris fuzárium rezisztencia QTL jelenlétét az adott kromoszómaszakaszon (Szabó-Hevér és mtsai, 2012).

A térképezéshez használt populációk méretének megválasztásánál figyelembe kell venni, hogy a több vonal használata mindig pontosabb térképezési adatokat eredményez, mintha kevesebbvel dolgoznak (Beavis, 1998). A legtöbb vizsgálatnál 100-200 közötti

vonalat használnak. Kis hatású QTL-ek esetében a nagyobb növényszám használata célszerű. Kevesebb, mint 100 rekombináns vonal használata a nagy hatású QTL-eken kívül más QTL kimutatására nem alkalmas. A molekuláris markerek számának megválasztásánál az a legjobb, ha a markereink teljes lefedettséget biztosítanak a kromoszómákon (ne legyenek 20 cM-nál nagyobb távolságok a markerek között) (Buerstmayr és mtsai, 2009).

A QTL térképek készítéséhez három leginkább használt módszer az egy-marker térképezés, az egyszerű intervallum térképezés és az összetett intervallum térképezés (Tanksley, 1993; Liu, 1998). Az egy-marker térképezés során a QTL egy markerhez való kapcsoltságát vizsgálják. Előnye, hogy nem igényel kapcsoltsági térképet, és egyszerű számítógépes statisztikai programokkal elvégezhető. A statisztikai módszerek, amelyeket használni kell: t-próba, varianciaanalízis (ANOVA – analysis of variance) és lineáris regresszió. A fő hátránya az, hogy minél távolabb esik a QTL a markertől, annál kisebb az esély a kimutatására, mivel rekombináció következhet be QTL és marker között (Collard és mtsai, 2005).

Az egyszerű intervallum térképezés kapcsoltsági térképeket használ, és a szomszédos kapcsolt markerek közötti területet vizsgálja (Lander és Botstein, 1989; Liu, 1998). Az összetett intervallum térképezés ötvözi az intervallum térképezést a lineáris regresszióval (Jansen, 1993; Jansen és Stam, 1994; Zeng, 1993, 1994).

Több számítógépes program is használható intervallum térképezés elvégzéséhez: pl. QTL Cartographer (Basten és mtsai, 2001), MapManager QTX (Manly és mtsai, 2001), PLABQTL (Utz és Melchinger, 1996), JoinMap[®] 3.0 és MapQTL[®] 5 (Van Ooijen és Voorrips 2001; Van Ooijen, 2004).

Az intervallum térképezés a QTL valószínű helyét ábrázolja a szomszédos markerek között. Az eredményeket általában LRS (likelihood ratio statistic) vagy LOD (logarithm of odds) értékben kapjuk meg. A LOD érték számszerűsíti, hogy a megfigyelt adatok bekövetkezésének valószínűsége mennyivel nagyobb, ha az adott helyen egy QTL van, mint ha nincs.

2.7. Markerekkel támogatott szelekció (MAS)

Markerekkel támogatott szelekciót (MAS) már alkalmaznak a fuzárium rezisztencianemesítés során. A MAS egy olyan módszer, ahol a használni kívánt fenotípust egy marker genotípusa alapján választják ki. Azonban a QTL térképezéshez használt markerek általában nem megfelelőek a fenotípus egyértelmű és biztos meghatározásához.

Általánosan azt lehet elmondani, hogy a MAS-hoz használható markerfejlesztés a következő lépésekből áll: nagyfelbontású térképezés, a marker validálása és átalakítása könnyen és megbízhatóan használható markerré (Collard és mtsai, 2005).

2.8. A térképezési munkánk előzményei

Buerstmayr és mtsai (2009) 22 fuzárium rezisztencia QTL-t összesítettek, amelyek különböző térképező populációkban a 7D kromoszóma kivételével a többin előfordulnak. Azóta már a 7D kromoszómán is írtak le fuzárium rezisztencia QTL-eket (Srinivasachary és mtsai, 2008; Li és mtsai, 2011). A legfontosabb QTL-eket a 2D, 3BS, 3BSc, 4B, 5AS és 6BS kromoszómákon írták le (McCartney és mtsai, 2004; Yu és mtsai, 2006; Liu és mtsai, 2007), és független térképező populációkban is elvégezték validálásukat. A kiemelkedő rezisztenciával rendelkező kínai Sumai 3-ban, vagy annak leszármazottaiban írták le az eddig legjobban jellemzett QTL-eket: a II. típusú rezisztenciát kódoló, 3BS kromoszómán lévő *Fhb1*, és a 6B kromoszómán lévő *Fhb2* (Waldron és mtsai, 1999; Anderson és mtsai, 2001; Buerstmayr és mtsai, 2002, 2003; Somers és mtsai, 2003; Lemmens és mtsai, 2005; Cuthbert és mtsai, 2006).

A Frontana egy mérsékelten rezisztens brazil tavaszi búzafajta, amelyet a Fronteira/Mentana keresztezésből állítottak elő (Van Ginkel és mtsai, 1996). A fajta kalászfuzáriózis rezisztenciájának hátterét több kutató csoport is vizsgálta. Singh és mtsai (1995) megállapítása szerint, a Frontana rezisztenciáját legalább három kis hatású gén együttműködése határozza meg. Yang és mtsai (2006) azt állapította meg, hogy a Frontananak nincsen a Sumai 3-al közös QTL-e a 3B és 6B kromoszómán, ami a Frontana rezisztenciaforrásként való alkalmasságát igazolja.

Steiner és mtsai (2004) Frontana/Remus DH populációval (210 vonal) végzett vizsgálatain során I. típusú fuzárium rezisztencia QTL-eket talált a Frontana 3A, 5A, 2B, 4B és 6B kromoszómáin. Mardi és mtsai (2006) a Frontana/Falat populáción való vizsgálatain során a 3AL QTL-t, és két további QTL-t talált az 1BL és 7AS kromoszómán. Srinivasachary és mtsai (2008) az 1B, 2B, 3A, 6A, 7A és 7D kromoszómákon találtak Frontana fuzárium rezisztencia QTL-eket, egy RL4137 (Frontana-ból származó kalászfuzárium rezisztens vonal) és Timgalen fajták keresztezéséből létrehozott populációval végzett vizsgálataik során. Ezek a szerzők a kalászfertőzöttségi tüneteken kívül, más kalászfuzáriózis rezisztenciát jellemző tüneteket nem vettek figyelembe. A legtöbb vizsgálat során általában csak egy *F. culmorum* és/vagy *F. graminearum*

izolátumot, vagy inokulom keveréket használnak két-három éven keresztül, a fenotipizálás során (Mardi és mtsai, 2005, 2006; Chen. és mtsai, 2007; Klahr és mtsai, 2007).

Szabó-Hevér és mtsai,(2012) a Frontana/Remus DH populáción (210 vonal) négy éven keresztül végzett vizsgálatai során összesen hat izolátummal kapott kalászfertőzőttség és szemfertőzőttség adatokkal végzett QTL térképezést. Kalászfertőzőttséggel és szemfertőzőttséggel egyaránt kapcsolt QTL-eket azonosított a 2B, 4B, 5A és 7B kromoszómákon. Kalászfertőzőttséggel kapcsolt QTL-eket írt le a 3A, 4A és 6B kromoszómákon, illetve szemfertőzőttséggel kapcsolt QTL-t 3D kromoszómán, és a kromoszómához nem térképezhető *Xs12m15_4* markernél.

2.9. Rezisztenciagén analógok (RGAs)

A növény patogén interakció mechanizmusának része a különböző szignálok aktivációja, ami igen gyors válaszreakcióhoz vezethet a kórokozókkal szemben. Ez a válaszreakció segíthet megakadályozni a növényben a betegség további terjedését. A növényi védekezési szignálok indukciójához tartozik a specifikus patogének által termelt effektorok felismerése, ez a gazdanövény úgynevezett rezisztenciagénjének (R-gén) termékével történik meg. Számos egy-egy növényre jellemző rezisztenciagént jellemeztek már, és használnak a nemesítő programokban (Gururani és mtsai, 2012).

Az R-gének molekuláris jellemzése lehetővé tette közvetlen markerek fejlesztését, amelyeket rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markereknek nevezünk. Az RGAP markerek a rezisztenciagének konzervált régióira – nukleotid-kötő hely (NBS), leucinban gazdag ismétlődés (LRR), protein kináz – tervezett primereken alapulnak (Chen és mtsai, 1998). Több RGAP markert használtak már sikeresen rezisztenciagénekhez (Yan és mtsai, 2003; Xie és mtsai, 2004; Chen és mtsai, 2006), köztük kalászfuzárium rezisztencia QTL-hez (Guo és mtsai, 2006; Mazaheri és mtsai, 2008) kapcsolt molekuláris markerek fejlesztéséhez búzában.

3. Célkitűzés

Munkánk során a Frontana brazil búzafajta fuzárium rezisztenciájának molekuláris hátterét vizsgáltuk. A fuzáriummal szemben történő védekezés legkörnyezetkímélőbb és leggazdaságosabb módja a rezisztencianemesítés. A nagy ellenállóképességű kínai Sumai 3 mellett több fontos közepes ellenállóképességű rezisztenciaforrás is ismert. Ezek közé tartozik a Frontana, amelynek rezisztenciáját több kutató csoport is vizsgálta különböző térképező populációkban.

QTL térképezési munkánk során a GK Mini Manó/Frontana DH populációval dolgoztunk. A növényanyagot a pontosabb eredmények érdekében összesen hat epidémiái szituációban vizsgáltuk két kísérleti év során szántóföldön. Irodalmi adatok szerint egyedülálló, hogy a Frontanában, a kalászfertőzöttség mellett, a szemfertőzöttséget és a dezoxinivalenol (DON) tartalmat is vizsgáltuk. A több rezisztenciafaktor vizsgálatát azért végeztük el, mivel valószínűsíthető, hogy a több fuzárium rezisztencia típussal kapcsolt molekuláris markerek nagyobb eséllyel jelzik valódi, molekuláris fuzárium rezisztencia QTL jelenlétét az adott kromoszóma szakaszon.

Hosszú távú céljaink közé tartozik rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markerek azonosítása a populációban, és annak vizsgálata, hogy ezek kapcsoltak-e, illetve átfedésben vannak-e a térképezett fuzárium rezisztencia QTL-ekkel.

A dolgozatban leírt munkánk elkészítésénél két célt határoztunk meg:

1. A legtöbb kutatócsoport eredményei alapján Frontana eredetű bizonyítottan fuzárium rezisztenciával kapcsolt QTL-t hordozó 3A, 5A és 6B kromoszómán kalászfertőzöttséggel, szemfertőzöttséggel és DON tartalommal kapcsolt QTL-ek térképezése.
2. Négy rezisztenciagén analóg (RGA) primer tesztelése a két szülőn, és a populáció hét fogékony és hét rezisztens vonalán rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markerek azonosítása érdekében.

4. Anyag és módszer

4.1. Növényi anyag

A vizsgált dihaploid (DH) populációt (176 vonal) a Frontana és GK Mini Manó fajták keresztezéséből hozták létre portok-tenyésztési növényregenerálási rendszer segítségével a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft.-ben. A Frontana (Fronreira/Mentana) egy Brazíliából származó tavaszi búzafajta, amely kalászfuzáriózissal szemben közepesen ellenálló. A szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft.-ben nemesítették a GK Mini Manó búza vonalat, ami egy jó termés hozamú fajta, azonban törpe típusú és bizonyos betegségekre fogékony, mint például a kalászfuzáriózis, illetve a lisztharmat.

4.2. Szántóföldi kísérletek

4.2.1. Szántóföldi elrendezés

A növényi anyagot Szegeden a Gabonakutató Nonprofit Kft. kecskés-telepi tenyészterületében vizsgálták két éven keresztül: 2008-ban és 2009-ben. A vetés az őszi búzánál megszokott időben történt Wintersteiger Plot Spider vetőgéppel (Wintersteiger GmbH, Ried, Ausztria). A parcellákat (azaz genotípusokat) két ismétlésben vetették, randomizált kóplett blokk elrendezésben, hogy így később a kísérletek fő parcelláiként szolgáljanak. Mindkét ismétlésben 1,5 m hosszú sorok voltak. A fő parcellák szélessége aszerint alakult, hogy hány izolátumot használtak a fertőzéshez: egy sorban egy kalászcsoportot fertőztek, tehát pl. 3 izolátummal történő fertőzés esetén 3 sorból álltak a parcellák.

4.2.2. Inokulum készítés és fertőzés

A fuzárium szuszpenziót Czapek-Dox folyékony táptalajjal töltött 10 literes hőálló lombikokban készítették (1000 cm³ tápoldat: 30 g szacharóz; 2 g NaNO₃; 2 g KH₂PO₄; 0,5 g KCl; 0,5 g MgSO₄; 10 mg Fe₂(SO₄)₃; 1000 cm³ H₂O; 18 g agar) (Mesterházy, 1977). Egy hétig levegőztették szobahőmérsékleten, ezután felhasználásig 4 °C-on tárolták. Az izolátumok agresszivitását Petri csészékben tesztelték Mesterházy (1985) módszere szerint. Azokat az izolátumokat, amelyek nem bizonyultak elég agresszívnek kizárták a kísérletből. Minden genotípust *F. culmorum* és/vagy *F. graminearum* egyedi izolátumaival fertőzték. Az izolátumok inokulumainak részleteit az 1. táblázatban közöljük. A kísérletek során összesen hat izolátumot használtak.

1. táblázat: A két év kísérletei során használt izolátumok neve, a szántóföldi vizsgálatoknál használt konídiumok száma/cm³, és a patogenitási teszt eredményei (a fertőzött szemek százalékos aránya).

Év	Kísérlet száma	Izolátum neve	konídiumok száma/cm ³	Patogenitási teszt (%)
2008	1	Fg. 12377	5,7*10 ⁵	13,5
	2	Fc. 12551	2,2*10 ⁵	30,2
	3	Fg. 46.06	1.3*10 ⁵	35,8
2009	4	Fc. 12551	0,5*10 ⁵	52,1
	5	Fc. 12551	0,2*10 ⁵	41
	6	Fg. 12377	0 ^a	39,6

^a Csak micélium volt jelen.

A fertőzés teljes virágzáskor (Feekes fejlődési állapot 10.5.1) történt. A 15-25 kalászból álló csokrokat kézi permetezővel, mintánként körülbelül 15-20 cm³ gomba szuszpenzió felhasználásával permetezték le minden oldalról, Mesterházy (1987, 1995) leírása szerint. Egy sorba egy csokrot helyeztek, 30-40 cm távolságra egymástól.

A fertőzés után a csokrokat átlátszó polietilén zacskóval takarták le 48 óráig, hogy a fuzárium növekedéséhez optimális hőmérsékletet és páratartalmat biztosítsák. A zacskók eltávolítása után azonosító címkével ellátva, körülbelül a növény magasság felénél a növényeket lazán összekötve hagyták, annak érdekében, hogy a levelek megfelelően tudjanak fotoszintetizálni.

4.2.3. A fertőzöttség súlyosságának felmérése

A kalászfertőzöttség súlyosságának megfigyelését a fertőzés után 10 nappal kezdték, és minden negyedik nap ismételték. A kalászfertőzöttség értékelése 0-100-ig terjedő lineáris skálán történt (fertőzött kalászkák százalékos aránya). A megfigyeléseket 4 naponta végezték egészen addig, míg a kalászokon az érés tünetei nem jelentkeztek: ez átlagban négy alkalmat jelent egy szezonban.

A csokrokat metszőollóval aratták, mely során minden egyes csokrot külön papírtasakba helyeztek, és abban tárolták cséplésig. A cséplést cséplőgéppel (Wintersteiger LD 180, Ried, Ausztria), alacsony szélereősség mellett végezték, a töppedt, alacsony ezerszemtömegű magvak megőrzése érdekében. A pelyva eltávolítása légáramoltatáson alapuló szeparátorral (Ets Plaut-Aubry 41290, Conan-Oucques, Franciaország) történt. Ezután a szemfertőzöttség súlyosságát vizuálisan értékelték: fehér krétaporszerű és rózsaszín elszíneződésű magvak százalékának meghatározása. A töppedt, ám elszíneződést

nem mutató magvakat nem vették fuzárium fertőzöttnek, mert ezek a fertőzési pont fölötti elhalt kalászcspéből származnak (Lehocski-Krsjak és mtsai, 2010).

4.3. Laboratóriumi vizsgálatok

4.3.1. *Dezoxinivalenol (DON) akkumuláció vizsgálata*

A DON akkumulációt az egyes vonalak magvainak DON koncentráció (mg/kg) értékeivel jellemeztük. A DON analízist, a szántóföldi kísérlet egyes ismétléseinek összeöntött mintáin végeztük nagy teljesítményű folyadék kromatográfiával (HPLC), a következő protokoll szerint:

Minta előkészítés:

1. Egy gramm őrleményt extraháltunk 5 cm³ acetonitril: víz 84:16 (V/V %) arányú keverékével vertikális rázógép segítségével 2,5 órán keresztül.
2. Az extraktumot centrifugáltuk (10 000 rpm, 10 perc).
3. A laborban készített Al₂O₃:aktív szén (20:1, m/m %) keverékét tartalmazó szilárd fázisú extrakciós oszlopon (SPE) 1 cm³ extraktumot átengedtünk, majd az oszlopot 2 cm³ extrakciós oldószerrel mostuk. Az oszlopon áthaladó extraktum és oldószer elegyét centrifugális bepárlóban bepároltuk. Visszaoldottuk 500 µl acetonitril: víz 20:80 (V/V %) arányú elegyében és HPLC-fiolába pipettáztuk.

HPLC-körülmények:

Készülék: HP 1090 nagyhatékonyságú folyadékkromatográf (Agilent, Waldbronn).

Oszlop: Polaris C18-A (5 µm, 100 x 4,6 mm).

Előtétoszlop: Polaris C18-A (5 µm, 10 x 3mm).

Oldószerek:

„A”: víz

„B”: acetonitril

Gradiens:

0 perc – 5 perc 15 % B.

5 perc – 8 perc 15 % B.

8 perc – 10 perc 5 % B.

10 perc – 12 perc 5 % B.

Áramlási sebesség: 1 cm³/perc.

Injektált térfogat: 10 µl.

Oszlop hőmérséklete: 40 °C.

Detektálási hullámhossz: 219 nm.

4.3.2. Genomi DNS kivonása

A DNS-t fiatal hajtás levélből izolálták CTAB-módszer szerint (Rogers és Bendich, 1985). A DNS minőségének és mennyiségének mérését NanoDrop 1000 Spektrofotométerrel (Thermo Scientific Company) végezték.

4.3.3. A QTL térképezéshez használt molekuláris markerek vizsgálata

Az SSR markerek tesztelését a Gabonakutató Nonprofit Kft-ben végezték. A markerek nagy részét szakirodalom (Röder és mtsai, 1998; Somers és mtsai, 2004; Mardi és mtsai, 2006) alapján választották. A PCR reakciós elegy összetétele: 0,12 µM forward primer, 0,12 µM reverse primer, 1X PCR Master Mix (Fermentas) és 20 ng DNS templát 10 µl végtérfigatban. A PCR reakciót 96 mintahelyes Eppendorf Mastercycler[®] ep készülékkel végezték, a következő program szerint: 1 ciklus 8 perc 94 °C, majd 40 cikluson keresztül, minden ciklusban 5 perc 94 °C, 5 perc 50-60 °C, és 8 perc 72 °C, ezt követően 1 ciklus 5 perc 72 °C. A PCR termékeket 5 %-os poliakrilamid gélen választották el (Szabó-Hevér és mtsai, 2008, 2012).

A DArT analízis eredményét a Diversity Arrays Technology Pty Limited ausztrál cégtől rendeltük meg. Az Excel eredményfájl tartalmazza a marker neveket, statisztikai információkat, valamint azt, hogy egy adott marker egy adott genotípus DNS-ével hibridizált (jelölése: 1), vagy sem (jelölése: 0). A statisztikai információk közül a Reproducibility (a marker adatok reprodukálhatósága), a Call Rate (hiányzó adatok aránya), és a PIC (Polymorphism Information Content, polimorfizmus információ mennyisége, ami megmutatja a 0 és 1 értékek arányát) voltak a legfontosabbak.

4.3.4. Rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok

Négy rezisztenciagén analóg (RGA) primer párral (2. táblázat) végeztük el az előzetes teszteket. A primereket a populáció hét rezisztens és hét fogékony genotípusán, illetve a két szülőn teszteltük, a rezisztens és fogékony vonalak között polimorfizmust keresve, az egész populáción tesztelhető rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markerek meghatározásának céljából.

A PCR reakciót Bio-Rad iCycler iQ[™] Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc.) készülékkel végeztük. A PCR reakciós elegy összetétele: 0,6 µM forward primer, 0,6 µM reverse primer, 2X DreamTaq[™] PCR Master Mix (Fermentas) és 37,4 ng DNS templát 10

µl végtérfogatban. A PCR program beállítása Shi és mtsai (2001) alapján a következő volt: 1 ciklus 5 perc 94 °C, majd 45 ciklus, minden ciklusban 1 perc 94 °C, 1 perc 45 °C (a hőmérsékletváltás 94 °C-ról 45 °C-ra 2,5 perc alatt történt) és 2 perc 72 °C, majd végül 1 ciklus 7 perc 72 °C. A mintákat a PCR reakciót követően 4 °C-on tartottuk.

A PCR terméket 5 %-os poliakrilamid gélen választottuk el, melyet követően ezüst-festést alkalmaztunk Bassam és mtsai (1995) módszere szerint.

2. táblázat: Rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markerek meghatározásához, az előzetes tesztekben használt rezisztenciagén analóg (RGA) primer párok polaritás, és szekvencia adatai.

Primer párok (forward-reverse)	polaritás	Szekvencia 5'-3'	Forrás
PtoF-PtoR	forward reverse	GTTTACAAGGGTGTTTTCG TATTATGCGACTCCACTGCC	Wang és mtsai (1998)
NF-NR	forward reverse	ATGGTGTTTCGGATTATGGGG TTGTGTCGGAGTTGGAGGTG	Wang és mtsai (1998)
Pto kin 1-Pto kin 2	forward reverse	GCATTGGAACAAGGTGAA AGGGGGACCACCACGTAG	Chen és mtsai (1998)
Pto kin 3-Pto kin 4	forward reverse	TAGTTCGGACGTTTACAT AGTGTCTTGTAGGGTATC	Chen és mtsai (1998)

4.4. Statisztikai analízis

4.4.1. A kalászfuzáriózis rezisztenciát jellemző tulajdonságok statisztikai elemzése

Az átlagok, a minimum és maximum értékek, és a szórás kiszámításához Microsoft Office Excel számítógépes programot használtunk. A normál eloszlás és korreláció vizsgálatokat, és a kéttényezős varianciaanalízist ismétlés nélkül a program Analysis ToolPak bővítményével végeztük. A kéttényezős varianciaanalízis vizsgálatot ismétléssel az SPSS 15.0 program „General Linear Model” (GLM) funkciójával végeztük el, amellyel a genotípus x kísérlet kölcsönhatást (GxE) vizsgáltuk.

A különböző években használt eltérő izolátumokat egyedi kísérletként (epidémiai szituáció) elemeztük. Mivel a fuzárium rezisztencia nem fajspecifikus (Mesterházy, 1995, 2002a), ezért az *F. culmorum* és *F. graminearum* által okozott epidémiák együtt elemezhetőek. Az örökölhetőséget Nyquist (1991) szerint számítottuk ki, a következő képletet használva: H^2 a kísérletek között = $1 - (MS_{G \times E} / MS_G)$ ($MS_{G \times E}$: átlagos eltérés négyzetösszeg genotípus x kísérlet; MS_G : átlagos eltérés négyzetösszeg genotípus).

4.4.2. QTL analízis

A QTL térképezést a 3A, 5A és 6B kromoszómákon végeztük el.

A kapcsoltsági csoportok meghatározását a JoinMap[®] 3.0 (Van Ooijen és Voorrips, 2001), az összetett intervallum térképezést pedig MapQTL[®] 5 (Van Ooijen, 2004) számítógépes programok segítségével végeztük. A kapcsoltsági csoportok meghatározásához 0,45 maximális rekombinációs gyakoriság értéket használtunk.

Az intervallum térképezést a két kísérleti év kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség és DON akkumuláció adataival, valamint a két év adatának összesített átlagaival is elvégeztük. A QTL-ek meghatározásánál a permutációs teszt során kapott 1,7-nél magasabb LOD értékeket ítéltünk szignifikánsnak.

Az eredmények megvitatásakor a molekuláris markerek összehasonlítását, a Triticarte[®] búza genom DArT marker (www.triticarte.com.au), és Somers és mtsai (2004) mikroszatellit kapcsoltsági térképe alapján végeztük.

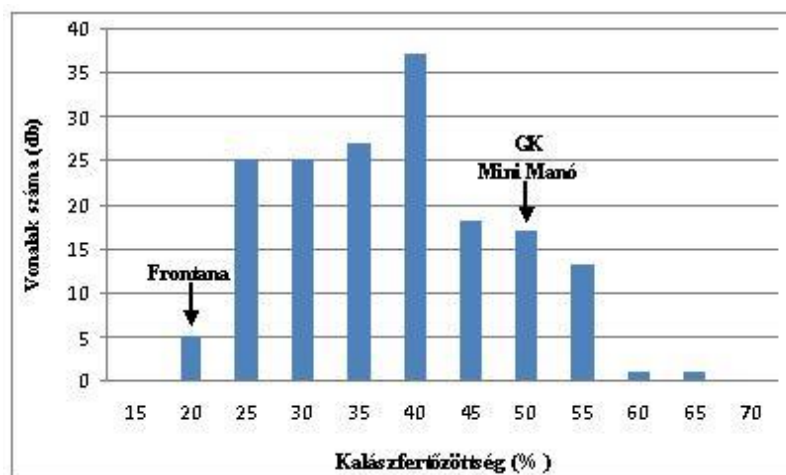
5. Eredmények

5.1. A kalászfuzáriózis rezisztenciát jellemző tulajdonságok statisztikai elemzése

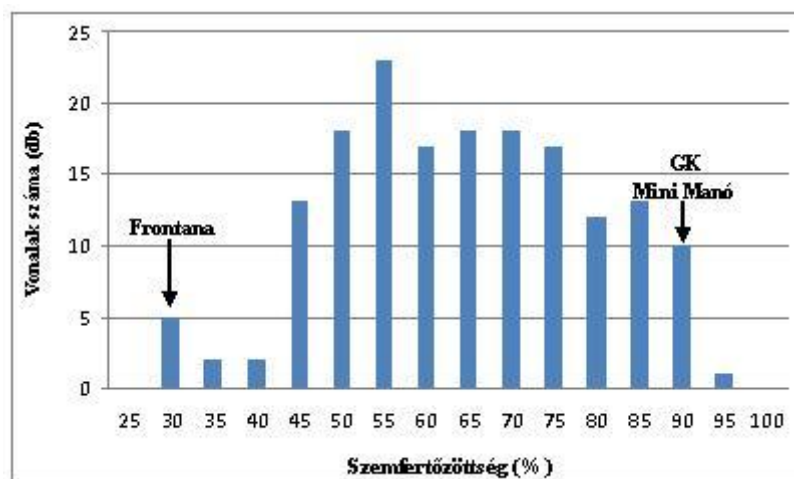
A 3. táblázatban adjuk meg az egyes kísérletekben (1-6) kapott kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség és DON adatokkal kapott populáció átlagot, a két szülő átlagát, a populáció minimum, maximum és szórás értékeit. A kísérletekhez használt különböző izolátumok és a két év környezeti tényezőinek különbsége természetes változatosságot okozott a populáció és a szülői átlagok között. A két szülő a kalászfuzáriózissal szembeni ellenállóképességének megfelelő rezisztenciaszintet mutatott. A kísérletek összesített kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség és DON adatok átlagának eloszlását a populációban, az 1., 2. és 3. ábrán mutatjuk be. A szülők kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség és DON értékei közötti nagy eltérésnek tulajdonítható a szignifikáns genetikai változatosság a térképező populációban.

3. táblázat: A GK Mini Manó/Frontana DH populáció vizsgálata során alkalmazott *Fusarium culmorum* (Fc.) és *Fusarium graminearum* (Fg.) izolátumok által okozott kalászfertőzöttség (FHB) és szemfertőzöttség (FDK) és dezoxinivalenol (DON) adatok átlag, minimum, maximum és szórás értékei.

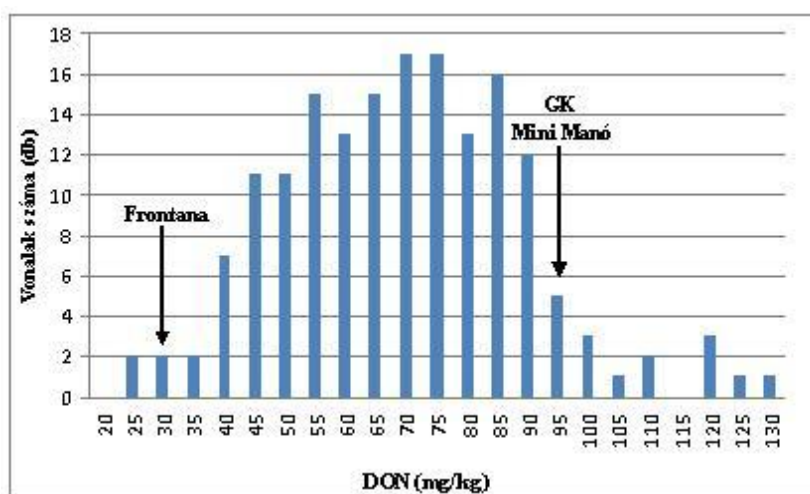
Kísérlet száma	Izolátum neve	Jellemző	Frontana	GK Mini Manó	Populáció átlag	Populáció minimum	Populáció maximum	Populáció szórása
1	Fg. 12377	FHB (%)	39,3	65,6	52,5	18,3	85,0	12,6
		FDK (%)	50,0	97,5	84,9	30,0	100,0	12,8
		DON (mg/kg)	47,6	84,4	67,5	23,6	142,5	20,6
2	Fc. 12551	FHB (%)	25,3	54,1	41,1	6,3	81,3	14,5
		FDK (%)	43,8	94,5	79,1	15,0	100,0	16,9
		DON (mg/kg)	100,2	225,7	192,9	52,8	492,2	75,2
3	Fg. 46.06	FHB (%)	33,2	71,6	56,1	20,8	86,3	13,5
		FDK (%)	57,5	92,8	81,2	20,0	100,0	22,1
		DON (mg/kg)	30,0	64,8	57,3	3,6	150,9	22,1
4	Fc. 12551	FHB (%)	2,5	27,6	15,2	0,0	53,2	10,8
		FDK (%)	1,3	78,8	30,4	0,0	90,0	25,5
		DON (mg/kg)	2,2	38,0	17,7	1,6	50,8	11,4
5	Fc. 12551	FHB (%)	2,3	36,5	22,9	0,0	64,0	12,7
		FDK (%)	0,5	87,5	45,7	0,0	95,0	27,0
		DON (mg/kg)	0,4	90,8	35,6	0,3	93,5	21,1
6	Fg. 12377	FHB (%)	10,1	39,5	24,9	0,8	67,0	13,7
		FDK (%)	9,0	81,3	48,6	0,0	98,0	28,8
		DON (mg/kg)	8,0	59,0	29,2	2,4	76,4	17,9



1. ábra: A kísérletek összesített kalászfertőzöttség átlagainak eloszlása a két szülő (GK Mini Manó és Frontana) és 169 DH vonal között.



2. ábra: A kísérletek összesített szemfertőzöttség átlagainak eloszlása a két szülő (GK Mini Manó és Frontana) és 169 DH vonal között.



3. ábra: A kísérletek összesített deoxinivalenol (DON) tartalom eloszlása a két szülő (GK Mini Manó és Frontana) és 169 DH vonal között.

Kéttényezős varianciaanalízist (ANOVA) ismétléssel végeztünk a kalászfertőzöttség (4. táblázat) és szemfertőzöttség (5. táblázat) adatokon a hat kísérlet között. A DON adatokkal kéttényezős varianciaanalízist ismétlés nélkül (6. táblázat) végeztünk, mivel a méréseket az egyes ismétlések összeöntött mintáiból végeztük. Szignifikáns kölcsönhatást találtunk mind a három tulajdonság (kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség, DON) és az izolátumok, továbbá mindhárom tulajdonság és a genotípusok között is. A kalászfertőzöttségi adatok kéttényezős varianciaanalízise szerint a kölcsönhatás és a genotípus főhatás közötti különbség több mint hétszeres, a szemfertőzöttségi adatoknál ugyanez a különbség ötszörös. Mindez az adatok pontosságára, jól ismételhetőségére utal. Az örökölhetőség értékek (kalászfertőzöttség estében 0,87; szemfertőzöttség estében 0,80), a kísérletek jó reprodukálhatóságát mutatják mindkét tulajdonság esetén.

4. táblázat: A kalászfertőzöttség kéttényezős varianciaanalízise ismétléssel a GK Mini Manó/Frontana DH populációban.

	df	MS	F-érték	P
Genotípus	173	1160,80	49,13	<0,0001
Kísérlet	5	99188,37	4197,70	<0,0001
Genotípus x Kísérlet	862	151,84	6,43	<0,0001
Error	1041	23,63		

5. táblázat: A szemfertőzöttség kéttényezős varianciaanalízise ismétléssel a GK Mini Manó/Frontana DH populációban.

	df	MS	F-érték	P
Genotípus	173	2823,91	50,44	<0,0001
Kísérlet	5	183044,08	3269,68	<0,0001
Genotípus x Kísérlet	862	553,45	9,89	<0,0001
Error	1041	55,98		

6. táblázat: A DON adatok kéttényezős varianciaanalízise ismétlés nélkül a GK Mini Manó/Frontana DH populációban.

	df	MS	F-érték	P
Genotípus	171	2523,99	2,58	<0,0001
Kísérlet	5	717949,23	732,96	<0,0001
Error	855	979,52		

Korrelációt mind a három tulajdonság (kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség, DON) egyes kísérletekben kapott értékei, egyes vizsgálati években kapott átlagai és összesített átlagai között számoltunk (Függelék 1. táblázat). Szignifikáns korrelációs értékeket kaptunk az egyes tulajdonságokon belül, míg a különböző tulajdonságok között kisebb

korreláció van. A szemfertőzöttség és kalászfertőzöttség súlyossága között, valamint a szemfertőzöttség és a DON adatok között szorosabb a korreláció, mint a kalászfertőzöttség és a DON adatok között. A 2008 évi Fg. 12377-es izolátum (1. kísérlet) és az Fg. 46.06-os izolátum (3. kísérlet) kalászfertőzöttség és DON adatai között a korreláció nem szignifikáns.

5.2. QTL térképezés

A kapcsoltsági térképek készítésénél a három kromoszómán (3A, 5A, 6B) 78 markert (14 SSR és 64 DArT) térképeztünk be öt kapcsoltsági csoportba, amelyek összesen 341 cM genetikai távolságot fednek le.

A QTL analízist az egyes izolátumok kalászfertőzöttség, szemfertőzöttség és DON adataival külön-külön is elvégeztük, illetve a két vizsgálati év átlag értékeivel és a kísérletek összesített átlagaival. Az összes azonosított fuzárium rezisztenciával kapcsolt kromoszóma régió Frontana eredetű. A betérképezett QTL-ek kísérletenkénti LOD értékeit a 7. táblázatban közöljük. Néhány kivételtől eltekintve, az évek átlag értékeivel és az összesített átlaggal elvégzett térképezés (8. táblázat) szignifikánsan jobb eredményeket adott, mint az egyes kísérletek értékeivel végzett. Az összesített átlagokkal kapott QTL LOD értékek görbéit az egyes kromoszómák kapcsoltsági térképein a Függelék 1., 2. és 3. ábráin mutatjuk be.

5.2.1. Kalászfertőzöttséggel kapcsolt QTL-ek:

Az 5A (Xgwm129-tPt-6183) 6B (Xgwm88) kromoszóma régiókon kaptunk kalászfertőzöttséggel kapcsolt QTL-eket. A 6B kromoszómán lévő QTL-nél kaptuk a legmagasabb LOD értéket (8,68), amely a fenotípusos variancia 22,8 %-ért felelős (VE). Mindkét QTL kapcsoltságot mutatott szemfertőzöttséggel és DON tartalommal is.

5.2.2. Szemfertőzöttséggel kapcsolt QTL-ek:

A 3A (wPt-1562-wPt-5886), 5A (wPt-3334-wPt-9748 és Xgwm129-tPt-6183) és a 6B (wPt-4218-wPt-6160 és Xgwm88) kromoszóma régiókon kaptunk szemfertőzöttséggel kapcsolt QTL-t. Az 5A (Xgwm129-tPt-6183) kromoszómán lévő QTL-nek van a legmagasabb LOD értéke (6,17), amely a fenotípusos variancia 16,3 %-ért felelős (VE). A 3A kromoszóma wPt-1562-wPt-5886 és az 5A kromoszóma wPt-3334-wPt-9748 markerrégiója a szemfertőzöttség mellett a DON akkumulációval is kapcsoltságot mutatott.

Az 5A (*Xgwm129-tPt-6183*) és a 6B (*Xgwm88*) kromoszóma régió is átfedést mutatott a DON tartalmat, és kalászfertőzöttséget befolyásoló QTL-ekkel is.

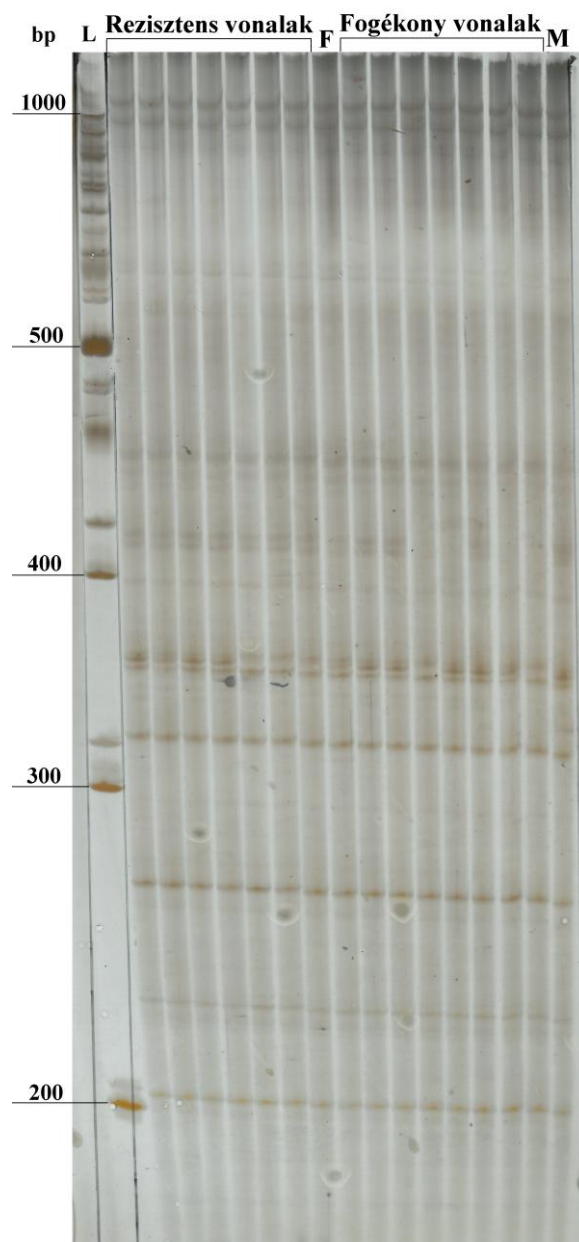
5.2.3. DON tartalommal kapcsolt QTL-ek:

A 3A (*wPt-1562-wPt-5886*), 5A (*wPt-3334-wPt-9748* és *Xgwm129-tPt-6183*) és a 6B (*Xgwm88*) kromoszóma régiókon kaptunk DON tartalommal kapcsolt QTL-t. A 6B (*Xgwm88*) kromoszóma régióban lévő QTL-nek van a legmagasabb LOD értéke (2,92), és a fenotípusos variancia mintegy 8,8 %-ért felelős (VE). Az 5A kromoszóma *wPt-3334-wPt-9748* és az *Xgwm129-tPt-6183* régiójában két elkülönülő DON akkumulációval kapcsolt QTL-t térképeztünk.

A 3A (*wPt-1562-wPt-5886*), 5A (*wPt-3334-wPt-9748*) kromoszóma régióban elhelyezkedő QTL a DON tartalom mellett, a szemfertőzöttséggel is kapcsolt. Az 5A (*Xgwm129-tPt-6183*) és 6B (*Xgwm88*) kromoszóma régiókban lévő fuzárium rezisztencia QTL-ek mindhárom tulajdonsággal kapcsoltak.

5.3. Rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok

Ahogy az a 4. ábrán látható az NF-NR primer pár esetén, a többi tesztelt RGA primer párral sem kaptunk egyértelműen polimorf mintázatot sem a szülők, sem a populáció hét rezisztens és hét fogékony vonala között. Így nem tudtunk rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markereket meghatározni, amelyet az egész populáción tesztelhetnénk.



4. ábra: A GK Mini Manó/Frontana DH populáció kalászfuzáriózisra fogékony szülőjének (M: GK Mini Manó), rezisztens szülőjének (F: Frontana) és a populáció 7 fogékony és 7 rezisztens vonalának NF-NR primer párral kapott PCR termékeinek 5 %-os poliakrilamid gélen történt elválasztásával kapott mintázata. L: DNS létra.

7. táblázat: A térképezési munkánk során betérképezett kalászfertőzőttséggel (FHB), szemfertőzőttséggel (FDK), és dezoxinivalenol (DON) tartalommal kapcsolt fuzárium rezisztencia QTL-ek kísérletenként (1-6) kapott LOD értékei. A vastagon szedett LOD értékeket tekintjük szignifikánsnak.

Marker	Kromoszóma	FHB						FDK						DON					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
		kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet	kísérlet
wPt-1562-wPt-5886	3A	0,12	0,15	0,56	0,16	0,06	0,07	1,74	1,73	2	0,62	0,28	0,6	2,08	1,32	1,99	1,51	1,85	0,75
wPt-3334-wPt-9748	5A	1,25	0,93	0,9	0,41	0,29	0,64	0,88	0,05	1,32	1,7	1,42	1,51	0,32	1,31	0,21	1,55	1,41	2,07
Xgwm129-tPt-6183	5A	5,69	2,39	3,17	3,85	4,53	2,65	3,3	4,33	3,72	6,41	3,85	2,19	1,1	1,86	1,44	3,59	1,89	0,6
wPt-4218-wPt-6160	6B	0,34	0,65	0,47	0,18	1,12	1,37	1,66	1,64	5,13	0,94	1,67	2,26	0,17	0,71	0,98	0,07	1,29	0,82
Xgwm88	6B	6,86	6,5	5,9	1,81	2,53	5,03	1,15	2,25	1,51	3,7	3,76	5,42	0,08	1,82	0,43	1,93	3,29	1,81

8. táblázat: A térképezési munkánk során betérképezett kalászfertőzőttséggel (FHB) és szemfertőzőttséggel (FDK) és dezoxinivalenol (DON) tartalommal kapcsolt fuzárium rezisztencia QTL-ek, a két vizsgálati év (2008 és 2009) adatainak átlagával, és a kísérletek összesített átlagával (Átlag) kapott LOD értékei, valamint a fenotípusos variancia érték, ami QTL hatásával magyarázható (VE). A vastagon szedett LOD értékeket tekintjük szignifikánsnak.

Marker	Kromoszóma	FHB						FDK						DON					
		2008		2009		Átlag		2008		2009		Átlag		2008		2009		Átlag	
		LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE	LOD	VE
wPt-1562-wPt-5886	3A	0,29	n.s.	0,01	n.s.	0,13	n.s.	2,69	11,2	0,57	n.s.	1,34	n.s.	2,05	7,9	1,72	6,6	2,62	9,9
wPt-3334-wPt-9748	5A	0,29	n.s.	0,31	n.s.	0,97	n.s.	0,8	n.s.	1,83	5,9	2,07	6,6	1,09	n.s.	2,4	n.s.	2,22	7,6
Xgwm129-tPt-6183	5A	4,15	10,4	4,56	11,4	5,69	15	5,85	14,3	4,64	12,4	6,17	16,3	2,2	5,8	1,97	5,5	2,67	7,9
wPt-4218-wPt-6160	6B	0,57	n.s.	0,9	n.s.	0,8	n.s.	3,61	10,8	1,78	n.s.	3,02	8,9	0,81	n.s.	0,9	n.s.	1,02	n.s.
Xgwm88	6B	7,81	19,6	3,31	12,7	8,68	22,8	2,46	6,4	4,95	12,4	5,74	14,4	1,43	n.s.	3,31	8,5	2,92	8,8

n.s.: nem szignifikáns

6. Eredmények értékelése

6.1. QTL térképezés eredményei

Az egyes kísérletekkel, és az átlag értékekkel kapott LOD adatokat összehasonlítva jól látható, hogy az átlag értékekkel a legtöbb esetben szignifikánsabb LOD értékeket kaptunk. Ez is alátámasztja azt, hogy a kis és közepes hatású fuzárium rezisztencia QTL-ek több epidémiái szituációban történő vizsgálata elengedhetetlen azok minél pontosabb meghatározásához.

Az elvégzett korrelációanalízisnél látható, hogy a vizsgált fuzárium rezisztencia tulajdonságok közül a szemfertőzöttség adatok és a DON tartalom között a legszorosabb az összefüggés. Mindez a térképezési munkánk eredményében is megmutatkozik, hiszen a szemfertőzöttséggel és DON tartalommal kapcsolt QTL-ek szorosabb átfedést mutattak egymással, mint a kalászfuzáriummal kapcsolt QTL-ekkel. Mindez arra az igen fontos új eredményre utal, hogy a növények valós fuzárium rezisztencia szintjét leginkább a szemfertőzöttségi és DON adatok tükrözik, a kalászfertőzöttségi adatokkal kevésbé megbízható eredményeket kapunk.

Irodalmi adatok alapján ez az első vizsgálat, amelyben mindhárom tünetre térképeztek, és DON tartalommal kapcsolt QTL-t azonosítottak Frontana eredetű populációban. Ez nemcsak Frontana, de más rezisztenciaforrások genetikai hátterét tanulmányozó kutatásokban is ritkaságnak számít.

Térképezési munkánk során a három kromoszómán összesen öt QTL régiót térképeztünk be. A 6B (*wPt-4218-wPt-6160* és *Xgwm88*) kromoszóma régiókon valószínűleg két külön fuzárium rezisztencia QTL helyezkedik el. Az 5A kromoszóma *wPt-3334-wPt-9748* és *Xgwm129-tPt-6183* markerrégiójában térképezett QTL-ek esetén nem lehet biztosan megmondani, hogy egy nagyobb kromoszóma régiót lefedő, vagy pedig két egymáshoz közel elhelyezkedő QTL-ről van szó.

Az általunk 3A kromoszómán azonosított DON tartalmat befolyásoló QTL-t Frontanában, vagy Frontana eredetű szülőben Steiner és mtsai (2004), Mardi és mtsai (2006), Berzonsky és mtsai (2007), Srinvasachary és mtsai (2008) és Szabó-Hevér és mtsai (2012) is kapcsoltak találta fuzárium rezisztenciával. A molekuláris marker adatok összehasonlítása alapján azt lehet mondani, hogy az általunk meghatározott DON tartalommal és a szemfertőzöttséggel kapcsolt 3A (*wPt-1562-wPt-5886*) QTL megegyezik a Mardi és mtsai (2006) által Frontana/Falat, Steiner és mtsai (2004) és Szabó-Hevér és

mtsai (2012) által Frontana/Remus populációban azonosított kalászfertőzőttséggel kapcsolt QTL-lel.

Az általunk 5A kromoszóma *Xgwm129-tPt-6183* markerrégióban térképezett kalászfertőzőttséggel, szemfertőzőttséggel és DON tartalommal kapcsolt QTL megegyezik a Frontana/Remus populációban Steiner és mtsai (2004) által kalászfertőzőttséggel, valamint Szabó-Hevér és mtsai (2008, 2012) által kalászfertőzőttséggel és szemfertőzőttséggel kapcsolt QTL-lel.

A 6B kromoszóma *wPt-4218-wPt-6160* régióban térképezett szemfertőzőttséggel kapcsolt QTL megegyezik a Frontana/Remus populációban Szabó-Hevér és mtsai (2012) által térképezett kalászfertőzőttséggel kapcsolt QTL-lel. A 6B kromoszóma *wPt-4218-wPt-6160* és *Xgwm88* markerrégióján lévő QTL-ekkel átfedő QTL-eket ázsiai búzafajták térképezése során írtak le korábban (Shen és mtsai, 2003; Yang és mtsai, 2005). Azonban nem úgy tűnik, hogy az általunk térképezett QTL-ek a Sumai 3-ból származó *Fhb2*-vel lennének azonosak.

Frontana-ból származó szemfertőzőttséggel kapcsolt QTL-eket Szabó-Hevér és mtsai (2012) azonosított először. Vizsgálataik során azonban az általunk szemfertőzőttséggel is kapcsolt régióként azonosított 3A (*wPt-1562-wPt-5886*) és 6B (*wPt-4218-wPt-6160*, *Xgwm88*) kromoszóma régiókon nem kaptak szemfertőzőttséggel kapcsolt QTL-eket.

Vizsgálataink során a legmagasabb LOD és VE értékeket az 5A (*Xgwm129-tPt-6183*) és 6B (*Xgwm88*) kromoszóma régiókon kaptunk. Ez a két kromoszóma régió mind a három vizsgált rezisztencia típussal kapcsolságot mutatott. Ebből arra következtethetünk, hogy ezek stabil QTL-ek. Nem tudtuk azonban egyértelműen megerősíteni, hogy az egyéb térképező populációkban 6B kromoszómán leírt fuzárium rezisztenciával kapcsolt QTL-ekkel átfedésben van-e az általunk *Xgwm88* markernél azonosított QTL.

6.2. Rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok

RGAP markerek azonosítására irányuló vizsgálatoknál előfordul, hogy igen nagy számú RGA primer tesztelése után csak viszonylag kevés primer párral kapnak polimorf mintázatot (Xie és mtsai, 2004; Guo és mtsai, 2006). Bár a tesztelt primerekkel nem sikerült polimorfizmust azonosítani a populációban, érdemes tovább folytatni a vizsgálatokat több primer párral, esetleg nem hagyományos primer párosításokkal (Xie és mtsai, 2004; Guo és mtsai, 2006; Mazaheri és mtsai, 2008) elvégezni az előzetes teszteket.

7. Összegzés

Munkánk során a legstabilabban térképezhető QTL-eket az 5A kromoszóma *Xgwm129-tPt-6183* és 6B kromoszóma *Xgwm88* markerrégiókon kaptuk. Úgy gondoljuk, hogy ezeket a markereket érdemes használni a markerekkel támogatott szelekció (MAS) során. Különösen igaz ez az 5A (*Xgwm129-tPt-6183*) kromoszómán lévő QTL markereire, hiszen ezt a QTL-t több Frontana eredetű populációban is sikerült azonosítani.

Kapott eredményeink is alátámasztják, hogy a fuzárium rezisztencia QTL térképezési vizsgálatoknál a QTL-ek minél pontosabb meghatározása, és jellemzése érdekében nagyon fontos több rezisztencia típus megfelelő patogenitású izolátumokkal történő vizsgálata több epidémiái szituációban. Mindez fokozottan érvényes az olyan környezeti hatásokra érzékeny kis és közepes hatású QTL-ek esetében, mint amivel a Frontana is rendelkezik.

Az is világosan látszik, hogy a fuzárium rezisztenciáért nem egy vagy két gén felelős, hanem több kis és közepes hatású QTL együttműködése alakítja ki. Úgy gondoljuk, hogy a rezisztencianemesítés során a kalászfertőzöttség mellett a szemfertőzöttségre és DON tartalomra is fontos szelektálni, hiszen az eredményeink is azt mutatják, hogy a különböző rezisztencia típusokat olykor különböző genetikai faktorok alakítják ki. Ez nemzetközi viszonylatban is igen fontos új eredmény.

Fontosnak tartjuk a rezisztenciagén analóg (RGA) vizsgálatok tovább folytatását, mert úgy véljük, hogy stabilan térképezhető Frontana fuzárium rezisztencia QTL-lel kapcsolt rezisztenciagén analóg polimorfizmus (RGAP) markerek azonosítása nagyban elősegítené a megbízható, egyszerűen használható markerek fejlesztését MAS-hoz, valamint szekvencia adatok alapján a rezisztencia hátterében álló génfunkciókra és élettani folyamatokra is fényt deríthetünk.

8. Irodalomjegyzék

- Abramson D., Clear R. M., Nowicki T. W. (1987): *Fusarium* species and trichothecene mycotoxins in suspect samples of 1985 Manitoba wheat. Canadian Journal of Plant Science, **67**: 611-619.
- Akbari M., Wenzl P., Caig V., Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmensick A., Kuchel H., Hayden M. J., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Kilian A. (2006): Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. Theoretical and Applied Genetics, **113**: 1409-1420.
- Anderson J. A., Stack R. W., Liu S., Waldron B.L., Fjeld A. D., Coyne C., Moreno-Sevilla B., Mitchell Fetch J., Song Q. J., Cregan P. B., Frohberg R.C. (2001): DNA markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in two wheat populations. Theoretical and Applied Genetics, **102**: 1164–1168.
- Arthur J.C. (1891): Wheat scab. Indiana Agricultural Experimental Station Bulletin, **36**: 129-132.
- Bassam B. J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P. M. (1995): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, **196**(1):80-83.
- Basten C., Weir B., Zeng Z-B. (2001): QTL Cartographer. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Beavis, W. D. (1998): QTL analysis: power, precision and accuracy. Paterson A. H. (Ed.), Molecular Dissection of Complex Traits, pp: 145-161. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Békési P. (2010): Ismét a kalászfuzáriózisról. Agrofórum, 2010 január: 53-56.
- Berzonsky W. A., Gebhard B. L., Gamotin E., Leach G. D., Ali S. (2007): A reciprocal backcross monosomic analysis of the scab resistant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar, 'Frontana'. Plant Breeding, **126**: 234-239.
- Bottalico A., Perrone G. (2002): Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals. European Journal of Plant Pathology, **108**: 611-624.

- Boutigny A. L., Richard-Forget F., Barreau C. (2008): Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* tricothecenes. *European Journal of Plant Pathology*, **121**: 411–423.
- Buerstmayr H., Lemmens M., Hartl L., Doldi L., Steiner B., Stierschneider M. Ruckebauer P. (2002): Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 84-91.
- Buerstmayr H., Steiner B., Hartl L., Griesser M., Aangerer N., Lengauer D., Miedaner T., Schneider B. Lemmens M. (2003): Molecular mapping of QTLs for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**: 503-508.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J. A. (2009): QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, **128**: 1-26.
- Campbell K. A. G., Lipps P. E. (1998): Allocation of resources: sources of variation in *Fusarium* head blight screening nurseries. *Phytopathology*, **88**: 1078-1086.
- Chen X. F., Faris J. D., Hu J. G., Stack R. W., Adhikari T., Elias E. M., Kianian S. F., Cai X. W. (2007): Saturation and comparative mapping of a major *Fusarium* head blight resistance QTL in tetraploid wheat. *Molecular Breeding*, **19**: 113-124.
- Chen X. M., Line R. F., Leung H. (1998): Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**: 345-355.
- Chen Y. P., Wang H. Z., Cao A. Z., Wang C. M, Chen P. D. (2006): Cloning of a resistance gene analog from wheat and development of a codominant PCR marker for *Pm21*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**: 715-721.
- Chester F. D. (1890) The scab of the wheat. Delaware Agricultural E.xperimental Station Report, **3**: 89-90.
- Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J. B., Pang E. C. K. (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, **142**: 169–196.
- Cuthbert P. A., Somers D. J., Thomas J., Cloutier S., Brule-Babel, A. (2006): Fine

- mapping Fhb1, a major gene controlling fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 1465-1472.
- Doohan F. M., Brennan J., Cooke B. M. (2003): Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, **109**: 755-768.
- Draeger R., Gosman N., Steed A., Chandler E., Thomsett M., Shrinivasachary, Schondelmaier J., Buerstmayr H., Lemmens M., Schmolke M., Mesterházy Á., Nicholson P. (2007): Identification of QTLs for resistance to *Fusarium* head blight, DON accumulation and associated traits in the winter wheat variety Arina. *Theoretical and Applied Genetics*, **115**: 617–625.
- Eeuwijk F. A. V., Mesterházy Á., Kling C. I., Ruckenbauer P., Saur L., Buerstmayr H., Lemmens M., Keizer L. C. P., Maurin N., Snijders C. H. A., Van Eeuwijk F. A. (1995): Assessing nonspecificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**: 221–222.
- Fauzi M.T., Paulitz T.C., (1994): The effect of plant growth regulators and nitrogen on *Fusarium* head blight of the spring wheat cultivar Max. *Plant Disease*, **78**: 289-92.
- Francki M. G., Walker E., Crawford A. C., Broughton S., Ohm H. W., Barclay I., Wilson R. E., McLean R. (2008): Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR and DArT markers. *Molecular Genetics and Genomics*, **281**: 181-191.
- Fuentes R. G., Mickelson H. R., Busch R. H., Dill-Macky R., Evans C. K., Thompson W. G., Wiersma J. V., Xie W., Dong Y., Anderson J. A. (2005): Resource allocation and cultivar stability in breeding for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. *Crop Science*, **45**: 1965-1972.
- Gang G., Miedaner T., Schuhmacher U., Schollenberger M., Geiger H. H. (1998): Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology*, **88**: 879–884.
- Gervais L., Dedryver F., Morlais J.-Y., Bodusseau V., Negre S., Bilous M., Groos C., Trottet M. (2003): Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in a European winter wheat. *Theoretical and Applied*

- Genetics, **106**: 961–970.
- Gilsinger J., Kong L., Shen X., Ohm H. (2005): DNA markers associated with low *Fusarium* head blight incidence and narrow flower opening in wheat. Theoretical and Applied Genetics, **110**: 1218–1225.
- Gou P.-G., Bai G.-H., Li R.-H., Shaner G., Baum M. (2006): Resistance gene analogs associated with *Fusarium* head blight resistance in wheat. Euphytica, **151**: 251–261.
- Gururani M. A., Venkatesh J., Upadhyaya C. P., Nookaraju A., Pandey S. K., Park S. W. (2012): Plant disease resistance genes: Current status and future directions. Physiological and Molecular Plant Pathology, **78**: 51–65.
- Halász Á., Valovics A. (2012): A magyarországi őszi búza tételek *Fusarium*-fertőzöttség felmérésének eredményei 2011-ben. Agrofórum, 2012 április: 28–31.
- Hollins T. W., Ruckebauer P., De Jong H. (2003): Progress towards wheat varieties with resistance to *Fusarium* head blight. Food Control, **14**: 239–244.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A. (2001): Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Research, **29** (4): e25.
- Jansen R. (1993): Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics, **135**: 205–211.
- Jansen R., Stam P. (1994): High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics, **136**: 1447–1455.
- Jones N., Ougham H., Thomas H. (1997) Markers and mapping: We are all geneticists now. New Phytologist, **137**: 165–177.
- Kiss E. (2005): Molekuláris növénynevelés. Fésűs L., Heszky L., Hornok L. (Eds): Mezőgazdasági biotechnológia, pp: 194–210. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft.
- Klahr A., Zimmermann G., Wenzel G., Mohler V. (2007): Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to *Fusarium* head blight in a European winter wheat cross. Euphytica, **154**: 17–28.
- Kosová K., Chrpová J., Šíp V. (2009): Cereal resistance to *Fusarium* head blight and possibilities of its improvement through breeding. Czech Journal of Genetics and

- Plant Breeding., **45**: 87–105.
- Kükedi E. (1972): Újabb adatok az őszi búza 1970-71. évi fusariumos fertőzöttségéhez. Növényvédelem, **8**: 289-294.
- Lander E., Botstein D. (1989): Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics **121**: 185–199.
- Lehozki-Krsjak S., Szabó-Hevér Á., Tóth B., Kótai C., Bartók T., Varga M., Farády L., Mesterházy Á. (2010). Prevention of *Fusarium* mycotoxin contamination by breeding and fungicide application to wheat. Food Additives & Contaminant Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, **27**: 616-628.
- Lemmens M., Scholz U., Berthiller F., Dall’asta C., Koutnik A., Schumacher R., Adam G., Buerstmayr H., Mesterházy Á., Krska R., Ruckebauer P. (2005): The ability to detoxify the mycotoxin deoxynivalenol colocalizes with a major quantitative trait locus for fusarium head blight resistance in wheat. Molecular Plant-Microbe Interactions, **18**: 1318-1324.
- Li C., Zhu H., Zhang C., Lin F., Xue S., Cao Y., Zhang Z., Zhang L., Ma Z. (2008): Mapping QTLs associated with *Fusarium*-damaged kernels in the Nanda 2419 × Wangshuibai population. Euphytica, **163**: 185–191.
- Li T., Bai G., Wu S., Gu S. (2011): Quantitative trait loci for resistance to fusarium head blight in a Chinese wheat landrace Haiyanzhong. Theoretical and Applied Genetics, **122**: 1497–1502.
- Liu, B. (1998): Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis. CRC Press, Boca Raton.
- Liu S., Abate Z. A., McKendry A. L. (2005): Inheritance of Fusarium head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie. Theoretical and Applied Genetics, **110**: 454–461.
- Liu S., Abate Z. A., Lu H., Musket T., Davis G. L., McKendry A. L. (2007): QTL associated with Fusarium head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie. Theoretical and Applied Genetics, **115**: 417–427.
- Lu Q. X., Szabó-Hevér Á., Bjornstadt A., Lillemo M., Semagn K., Mesterházy Á., Ji F., Shi J., Skinnes H. (2011): Two major resistance QTL are required to counteract the increased susceptibility to Fusarium head blight at the *Rht-D1b* gene in wheat.

Crop Science, **51**: 2430-2438.

- Ma H. X., Zhang K. M., Gao L., Bai G. H., Chen H. G., Cai Z. X., Lu W. Z. (2006a): Quantitative trait loci for resistance to fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in Wangshuibai wheat under field conditions. *Plant Pathology*, **55**: 739–745.
- Ma H. X., Bai G. H., Zhang X., Lu W. Z. (2006b): Main effects, epistasis, and environmental interactions of quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in a recombinant inbred population. *Phytopathology*, **96**: 534-541.
- Manly K. F., Cudmore Robert H. Jr., Meer J. M. (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* **12**: 930–932.
- Martin R. A., MacLeod J. A., Caldwell C. (1991): Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed. *Plant Disease*, **75**: 784-788.
- Mardi M., Buerstmayr H., Ghareyazie B., Lemmens M., Mohammadi S. A., Nolz R., Ruckebauer P. (2005): QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in wheat using a ‘Wangshuibai’-derived population. *Plant Breeding*, **124**: 329–333.
- Mardi M., Pazouki L., Delavar H., Kazemi M. B., Ghareyazie B., Steiner B., Nolz R., Lemmens M., Buerstmayr H. (2006): QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in wheat using a 'Frontana'-derived population. *Plant Breeding*, **125**: 313-317.
- Mazaheri M., Naghavi M. R., Ghaffari M. R., Pirseyedi S. M., Ghareyazie B., Abdemishani S., Mardi M. (2008): Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with the major QTL of fusarium head blight (FHB) resistance, *Qfhs.ndsu-3BS* in wheat – short communication. *Iranian Journal of Biotechnology*, **8** (2): 119-123.
- McCartney C. A., Somers D. J., Fedak G., Cao W. (2004). Haplotype diversity at fusarium head blight resistance QTLs in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 261-271.
- McLaughlin C. S., Vaughn M. H., Campbell J. M., Wei C. M., Stafford M. E., Hansin B. S. (1977): Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. Rodricks H. V., Hesseltine C. W., Mehlman M. A. (Eds.), *Mycotoxins in Human and Animal*

- Health, pp. 263-273. Pathotoxin Publishers, Park Forest South, IL, U.S.A..
- Mesterházy Á. (1977): Reaction of winter wheat varieties to four *Fusarium* species. *Phytopathologische Zeitschrift*, **90**: 104–112.
- Mesterházy, Á. (1987): Selection of head blight resistant wheats through improved seedling resistance. *Plant Breeding*, **98**: 25–36.
- Mesterházy Á. (1995): Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding*, **114**: 377–386.
- Mesterházy Á. (2002a): Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 675–684.
- Mesterházy Á. (2002b): Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Journal of Applied Genetics*, **43A**: 289–302.
- Mesterházy Á. (2003): Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides. Leonard K., Bushnell W. (Eds.): *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul (MN):APS Press. p. 363–380.
- Mesterházy Á., Bartók T., Kászonyi G., Varga M., Tóth B., Varga J. (2005): Common resistance to different *Fusarium* spp. causing *Fusarium* head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology*, **112**: 267–281.
- Miedaner T., Moldovan M., Ittu M. (2003): Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to fusarium head blight in a multienvironment wheat trial. *Phytopathology*, **93**: 1068-1072.
- Miller J. D., Arnison P. G. (1986): Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight-resistant wheat cultivar Frontana. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **8**: 147–150.
- Nyquist W. E. (1991): Estimation of heritability and prediction of selection response in plant populations. *Critical Reviews in Plant Science*, **10**: 235-322.
- Paillard S., Schnurbusch T., Tiwari R., Messmer M., Winzeler M., Keller B., Schachermayr G. (2004): QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 323–332.

- Parry D. W., Jenkinson P., McLeod L. (1995): Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathology*, **44**: 207-238.
- Paterson A. H. (1996): Mapping genes responsible for differences in phenotype. Paterson A. H. (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 41–54. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press; Austin, Texas.
- Röder M. S., Korzun V., Wenderhake K., Plaschke J., Tixier M. H., Leroy P., Ganal M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, **149**: 2007-2023.
- Rogers S. O., Bendich A. J. (1985): Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant-tissues. *Plant Molecular Biology*, **5**: 69-76.
- Schroeder H. W., Christensen J. J. (1963): Factors affecting the resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, **53**: 831–838.
- Semagn K., Bjornstadt A., Skinnes H., Maroy A. G., Tarkegne Y., William M. (2006): Distribution of DArT, AFLP and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome*, **49**: 545-555.
- Shen X., Zhou M., Lu W., Ohm H. (2003): Detection of Fusarium head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**: 1041–1047.
- Shi Z. X., Chen X. M., Line R. F., Leung H., Wellings C. R. (2001): Development of resistance gene analog polymorphism markers for the Yr9 gene resistance to wheat stripe rust. *Genome*, **44**: 509-516.
- Singh R. P., Ma H., Rajaram S. (1995): Genetic-analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Disease*, **79**: 238-240.
- Snijders C. H. A. (2004): Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology Letters*, **153**: 37–46.
- Snijders C. H. A., Eeuwijk F. A. V., Van Eeuwijk F. A. (1991): Genotype X strain interactions for resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **81**: 239–244.
- Somers D. J., Fedak G., Savard M. (2003): Molecular mapping of novel genes controlling *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation in spring wheat. *Genome*, **46**: 555-564.

- Somers D. J., Isaac P., Edwards K. (2004): A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 1105-1114.
- Srinivasachary, Gosman N., Steed A., Faure S., Bayles R., Jennings P., Nicholson P. (2008): Mapping of QTL associated with *Fusarium* head blight in spring wheat RL4137. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **44** (8): 147–159.
- Steiner B., Lemmens M., Griesser M., Scholz U., Schondelmaier J., Buerstmayr H. (2004): Molecular mapping of resistance to *Fusarium* head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 215–224.
- Szabó-Hevér Á., Tóth B., Lecchoczki-Krsjak S., Mesterházy Á. (2008): Mapping of FHB resistance QTLs in the Mini Mano/Frontana and Frontana/Remus populations. *Cereal Research Communication*, **36** (Suppl. B): 271-275.
- Szabó-Hevér Á., Lehoczki-Krsjak S., Tóth B., Purnhauser L., Buerstmayr H., Steiner B., Mesterházy Á. (2012): Identification and validation of fusarium head blight and *Fusarium*-damaged kernel QTL in a Frontana/Remus DH mapping population. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **34** (2): 224-238.
- Tanksley S. D. (1993): Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*, **27**: 205-233.
- Taylor M. (2004): Incorporation of *Fusarium* head blight resistance into European winter wheat breeding programmes. Canty S. M., Boring T., Wardwell J., Ward R. W. (Eds): *Proceedings of the 2nd International Symposium of Fusarium Head Blight Incorporating the 8th European Fusarium Seminar*. Orlando, pp: 195–196.
- Teich A. H., Hamilton J. R. (1985): Effects of cultural practices, soil phosphorus, potassium and pH on the incidence of *Fusarium* headblight and DON levels in wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**: 1429-1431.
- Teich A. H., Nelson K. (1984): Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. *Canadian Plant Disease Survey*, **64**: 11-13.
- Utz, H., Melchinger A., (1996): PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. Institut fuer Pflanzenzuechtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universitaet Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany.
- Van Ginkel M., Vanderschaar W., Yang Z. P., Rajaram S. (1996): Inheritance of

- resistance to scab in two wheat cultivars from Brazil and China. *Plant Disease*, **80**: 863-867.
- Van Ooijen J. W., Voorrips R. E. (2001): JoinMap Version 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Van Ooijen J. W. (2004): MapQTL Version 5: Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Waldron B. L., Moreno-Sevilla B., Anderson J. A., Stack R. W., Froberg R. C. (1999): RFLP mapping of QTL for fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Science*, **39**: 805-811.
- Wang S.P., Liu K.D., Wang J., Zhang Q.F. (1998): Identifying candidate disease resistance genes in rice by sequencing homology and chromosomal locations. *Acta Botanica Sinica*, **40**: 42-50.
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. (2004): Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley .*Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* **101**: 9915-9920.
- Winter P., Kahl G. (1995): Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **11**: 438–448.
- Xie C., Sun Q., Ni Z., Yang T., Nevo E., Fahima T. (2004): Identification of resistance gene analogue markers closely linked to wheat powdery mildew resistance gene *Pm31* – short communication. *Plant Breeding*, **124**: 198-200.
- Yan G. P., Chen X. M., Line R. F., Wellings C. R. (2003): Resistance gene analog polymorphism markers co-segregating with the *YR5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**: 636-643.
- Yang J., Bai G., Shaner G. E. (2005): Novel quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance in wheat cultivar Chokwang. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**: 1571–1579.
- Yang Z. P., Gilbert J., Fedak G., Somers D. J. (2005): Genetic characterization of QTL associated with resistance to *Fusarium* head blight in a doubled-haploid spring wheat population. *Genome*, **48**: 187–196.

- Yang Z. P., Gilbert J., Procubnier J. D. (2006): Genetic diversity of resistance genes controlling fusarium head blight with simple sequence repeat markers in thirty-six wheat accessions from east asian origin. *Euphytica*, **148**: 345-352.
- Yu J. B., Bai G. H., Cai S. B., Ban T. (2006). Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to *Fusarium* head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, **113**: 308-320.
- Zeng Z.-B., 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **90**: 10972–10976.
- Zeng Z.-B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, **136**: 1457–1468.
- Zhang X., Bai G., Bockus W., Ji X., Pan H. (2012): Quantitative trait loci for *Fusarium* head blight resistance in U.S. hard winter wheat cultivar Heyne. *Crop Science*, **52**: 1187-1194.
- Zhang X., Zhou M., Ren L., Bai G., Ma H., Scholten O.E., Guo P., Lu W. (2004): Molecular characterization of *Fusarium* head blight resistance from wheat variety Wangshuibai. *Euphytica*, **139**: 59–64.
- Zhou W.-C., Kolb F. L., Bai G.-H., Domier L. L., Boze L. K., Smith N. J. (2003): Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding*, **122**: 40–46.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Szabó-Hevér Ágnesnek és Prof. Dr. Mesterházy Ákosnak, valamint belső konzulensemnek Dr. Mainé Dr. Csiszár Jolánnak ösztönző és türelmes munkájukért, szakmai és személyes támogatásukért, mely nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Szeretném megköszönni a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Rezisztenciakutató Osztály munkatársainak Lehoczki-Krsjak Szabolcsnak, Csányi Annának, Bán Andrásnének és Becsey Magdolnának a szántóföldi vizsgálatok során végzett munkájukat, segítségüket és az Analitikai Labor munkatársainak Dr. Varga Mónikának és Zentai Beátának a toxin analízis során végzett munkájukat, és segítségüket.

Nyilatkozat

Alulírott *György Andrea*, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biológus MSc szakjának nappali tagozatos hallgatója, kijelentem, hogy a dolgozatomban foglaltak a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. Rezisztenciakutatási Osztály munkájának eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, módszerek, eszközök) használtam fel.

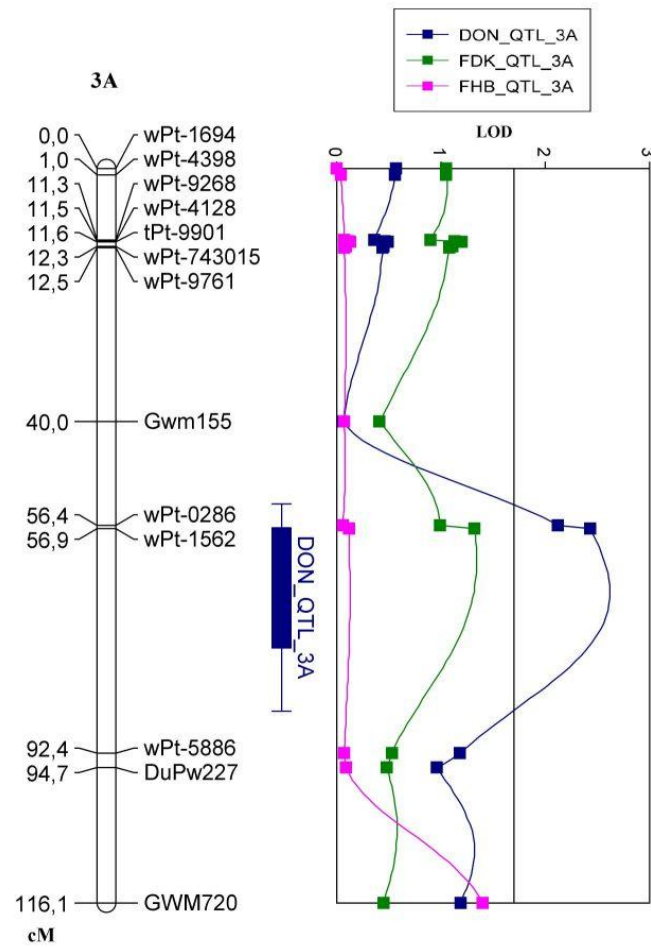
A dolgozatom készítése során:

- Részt vettem a dezoxinivalenol analízis során végzett munkákban.
- A rendelkezésemre bocsátott 2008 és 2009 évi fenotipizálási adatok statisztikai analízisét, a QTL térképezést és az RGA primerek tesztelését témavezetői felügyelet mellett, és önállóan végeztem.

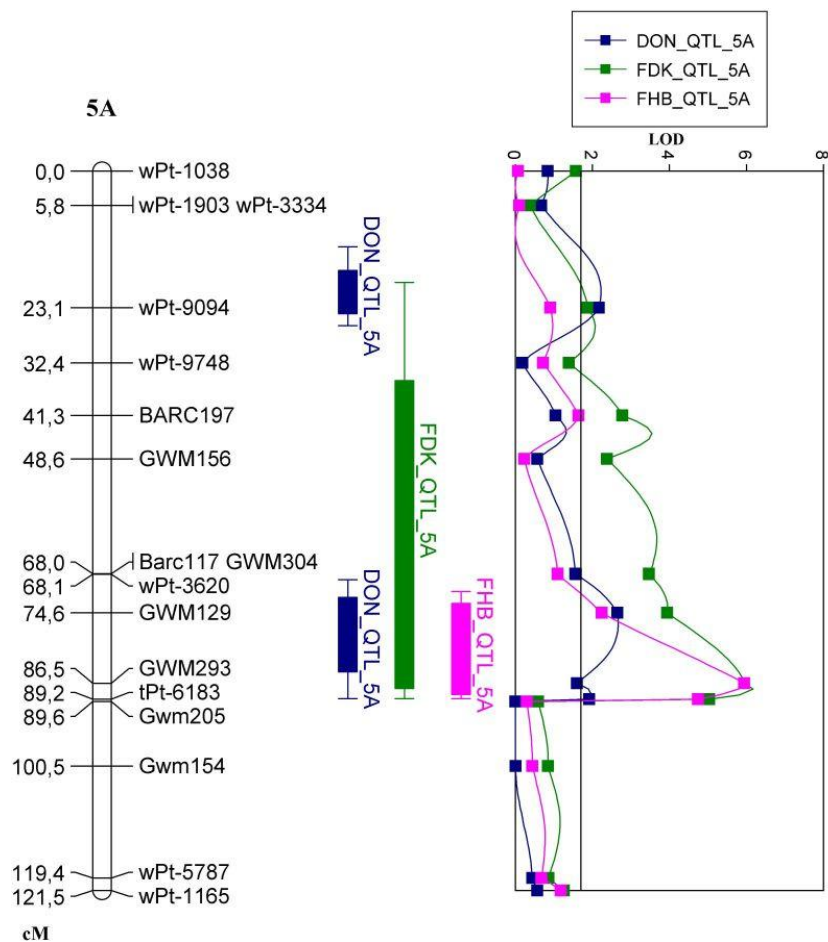
.....
aláírás

2012. 11. 05.

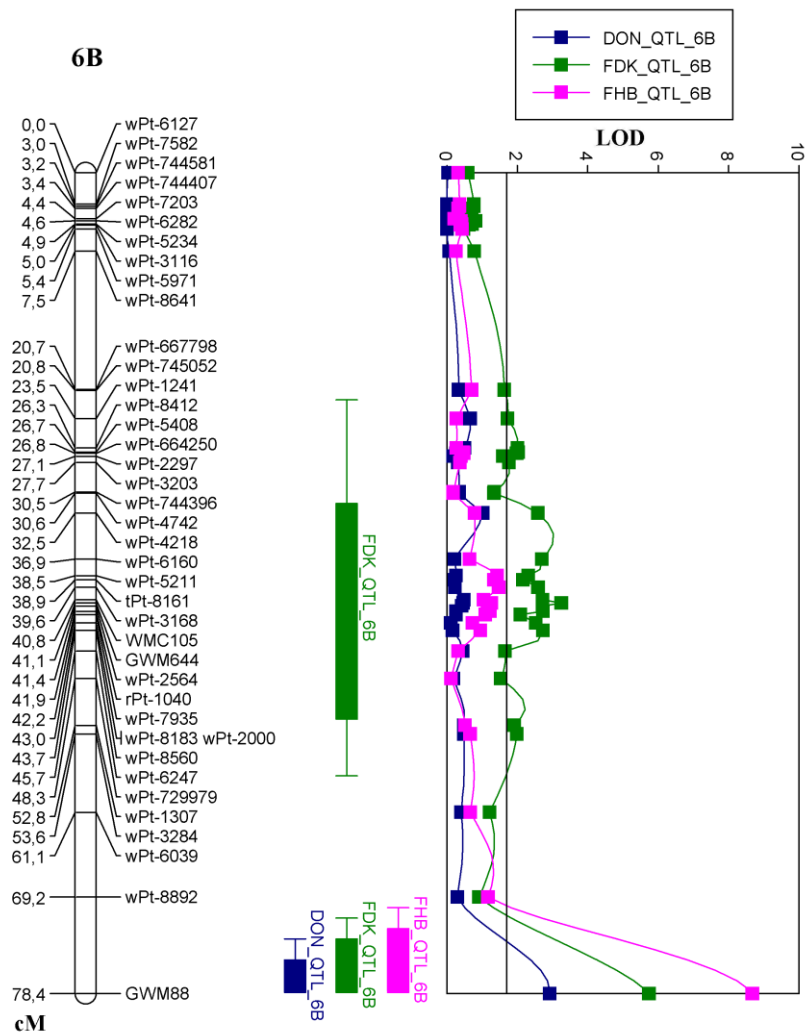
Függelék



1. ábra: A kísérletek összesített adataival kapott kalászfertőzöttséggel (FHB), szemfertőzöttséggel (FDK) és dezoxinivalenol (DON) akkumulációval kapcsolt fuzárium rezisztencia QTL-ek LOD értékei, és elhelyezkedése a 3A kromoszómán.



2. ábra: A kísérletek összesített adataival kapott kalászfertőzöttséggel (FHB), szemfertőzöttséggel (FDK) és dezoxinivalenol (DON) akkumulációval kapcsolt fuzárium rezisztencia QTL-ek LOD értékei, és elhelyezkedése az 5A kromoszómán.



3. ábra: A kísérletek összesített adataival kapott kalászfertőzöttséggel (FHB), szemfertőzöttséggel (FDK) és dezoxinivalenol (DON) akkumulációval kapcsolt fuzárium rezisztencia QTL-ek LOD értékei, és elhelyezkedése a 6B kromoszómán.

1. táblázat: A kalászfertőzöttség (FHB), szemfertőzöttség (FDK) és dezoxinivalenol (DON) akkumuláció korrelációja az egyes kísérletek (1-6), a két kísérleti év átlagai (2008 és 2009), és a kísérletek összesített átlagai (Átlag) között. (*: P=0,05; **: P=0,01;*: P=0,001; n.s.: nem szignifikáns)**

		FHB									FDK									DON														
		1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet	4. kísérlet	5. kísérlet	6. kísérlet	2008	2009	Átlag	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet	4. kísérlet	5. kísérlet	6. kísérlet	2008	2009	Átlag	1. kísérlet	2. kísérlet	3. kísérlet	4. kísérlet	5. kísérlet	6. kísérlet	2008	2009	Átlag						
FHB	1. kísérlet																																	
	2. kísérlet																																	
	3. kísérlet																																	
	4. kísérlet																																	
	5. kísérlet																																	
	6. kísérlet																																	
	2008																																	
	2009																																	
Átlag	0,81***	0,82***	0,81***	0,72***	0,80***	0,71***	0,88***	0,85***																										
FDK	1. kísérlet	0,37***	0,35***	0,46***	0,29**	0,33***	0,33***	0,43***	0,36***	0,46***																								
	2. kísérlet	0,34***	0,47***	0,45***	0,23*	0,31**	0,27**	0,46***	0,31**	0,46***																		0,74***						
	3. kísérlet	n.s.	n.s.	0,25**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.																		0,44***	0,41***					
	4. kísérlet	0,45***	0,35***	0,38***	0,75***	0,68***	0,59***	0,42***	0,76***	0,67***																		0,35***	0,29**	0,21*				
	5. kísérlet	0,33***	0,32***	0,29**	0,51***	0,75***	0,69***	0,34***	0,75***	0,61***																		0,30**	0,31**	n.s.	0,76***			
	6. kísérlet	0,22*	0,29**	0,24*	0,31**	0,61***	0,78***	0,27**	0,67***	0,53***																		0,31**	0,32***	n.s.	0,60***	0,83***		
	2008	0,35***	0,36***	0,47***	0,24*	0,30**	0,29**	0,43***	0,31**	0,44***																		0,87***	0,89***	0,73***	0,34***	0,31**	0,32***	0,36***
	2009	0,36***	0,35***	0,33***	0,57***	0,75***	0,77***	0,38***	0,80***	0,66***																		0,35***	0,34***	0,20*	0,86***	0,95***	0,90***	
Átlag	0,41***	0,41***	0,43***	0,54***	0,71***	0,72***	0,45***	0,76***	0,69***	0,62***	0,62***	0,44***	0,81***	0,88***	0,84***	0,67***	0,93***																	
DON	1. kísérlet	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,57***	0,47***	0,34***	n.s.	n.s.	0,19*	0,55***	n.s.	0,37***															
	2. kísérlet	n.s.	0,29**	0,32***	n.s.	n.s.	n.s.	0,28**	n.s.	0,27**	0,41***	0,52***	0,35***	0,19*	n.s.	0,20*	0,52***	0,20*	0,37***															
	3. kísérlet	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,33***	0,33***	0,54***	n.s.	n.s.	n.s.	0,48***	n.s.	0,27**															
	4. kísérlet	0,38***	0,30**	0,34***	0,73***	0,57***	0,47***	0,37***	0,66***	0,58***	0,36***	0,33***	0,20*	0,83***	0,58***	0,43***	0,36***	0,67***	0,67***							0,19*	0,20*	n.s.						
	5. kísérlet	0,21*	0,25**	0,23**	0,40***	0,62***	0,59***	0,25**	0,62***	0,49***	0,31**	0,38***	0,20*	0,63***	0,75***	0,65***	0,37***	0,75***	0,75***							0,23*	0,28**	0,19*	0,60***					
	6. kísérlet	0,20*	0,27**	0,22*	0,27**	0,59***	0,71***	0,25**	0,62***	0,49***	0,31**	0,37***	n.s.	0,55***	0,72***	0,83***	0,35***	0,78***	0,75***							0,28**	0,27**	n.s.	0,49***	0,72***				
	2008	n.s.	0,23*	0,27**	n.s.	n.s.	n.s.	0,23*	n.s.	0,22*	0,49***	0,55***	0,45***	0,19*	n.s.	0,21*	0,60***	0,20*	0,40***							0,72***	0,95***	0,68***	0,22*	0,29**	0,30**			
	2009	0,29**	0,32***	0,30**	0,50***	0,69***	0,70***	0,33***	0,73***	0,59***	0,38***	0,43***	0,24*	0,75***	0,81***	0,77***	0,42***	0,86***	0,84***							0,28**	0,31**	0,21*	0,75***	0,93***	0,88***	0,32***		
Átlag	n.s.	0,27**	0,28**	0,26**	0,35***	0,35***	0,27***	0,37***	0,37***	0,52***	0,59***	0,44***	0,43***	0,41***	0,45***	0,63***	0,47***	0,63***	0,70***	0,88***	0,60***	0,45***	0,58***	0,56***	0,92***	0,63***								

Rövidítések jegyzéke:

AFLP: amplified fragment length polymorphism, amplifikált fragmenthossz polimorfizmus.

ANOVA: analysis of variance, varianciaanalízis.

AUDPC: area under disease progress curve, járványgörbe alatti terület.

BC: backcross, visszakeresztezés.

DArT: diversity arrays technology.

df: degrees of freedom, szabadságfok.

DH: doubled haploid, dihaploid.

DON: deoxinivalenol.

FDK: *Fusarium*-damaged kernels, szemfertőzőttség.

FHB: *Fusarium* head blight, kalászfuzáriózis.

GxE: Genotype x Environment, genotípus x környezet kölcsönhatás.

HPLC: high-performance liquid chromatography, nagy teljesítményű folyadék kromatográfia.

LOD: logarithm of odds, a valószínűség logaritmus.

LRR: leucine-rich repeat, leucinban gazdag ismétlődés.

LRS: likelihood ratio statistic, valószínűségi arány statisztika.

MAS: marker-assisted selection, markerekkel támogatott szelekció.

MS: Mean Square, átlagos eltérés négyzetösszeg.

NBS: nucleotide binding site, nukleotid-kötő hely.

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció.

PIC: polymorphism information content, polimorfizmus információ mennyisége.

QTL: quantitative trait locus, mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókus.

RAPD: random amplification of polymorphic DNA, véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus.

RFLP: restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmenshossz polimorfizmus.

RGA: resistance gene analog, rezisztenciagén analóg.

RGAP: resistance gene analog polymorphism, rezisztenciagén analóg polimorfizmus.

RIL: recombinant inbred lines, rekombináns beltenyésztett vonalak.

SNP: single-nucleotide polymorphism, egyetlen nukleotid polimorfizmus.

SPE: solid-phase extraction, szilárd fázisú extrakció.

SSR: simple sequence repeat, mikroszatellit.

VE: explained phenotypic variance, magyarázott fenotípusos variancia.