

A sárga pigment tartalommal összefüggő molekuláris markerek azonosítása őszi durum búzában (*Triticum durum*, Desf.)

T038044 sz. Tematikus OTKA pályázat zárójelentése
Futamidő: 2002-2005

Bevezetés

A durum búza a világ második legnagyobb területen termesztett *Triticum* faja (Bozzini 1988), világszerte a száraztésztagyártás legfontosabb alapanyaga. A durum dara, az ún. szemolina jellegzetessége, hogy nagy mennyiségű sárga pigmentet (karotinoidokat) tartalmaz, ami a tésztakészítési- és főzési tulajdonságokat nem, vagy csak igen kis mértékben befolyásolja, ugyanakkor a tojás felhasználása nélkül készített tészta esztétikai értékét, szalmonella mentességét, tárolhatóságát és ezen keresztül értékesíthetőségét, exportálhatóságát alapvetően meghatározza. A pályázat időtartama alatt célunk az őszi durum búza sárga pigment tartalmával összefüggő molekuláris markerek azonosítása volt. Kutatásaink elsősorban olyan PCR alapú markerek felderítésére irányultak, melyek lehetővé teszik nagy mennyiségű törzs rövid idő alatt történő vizsgálatát.

Az őszi durum búzafajták

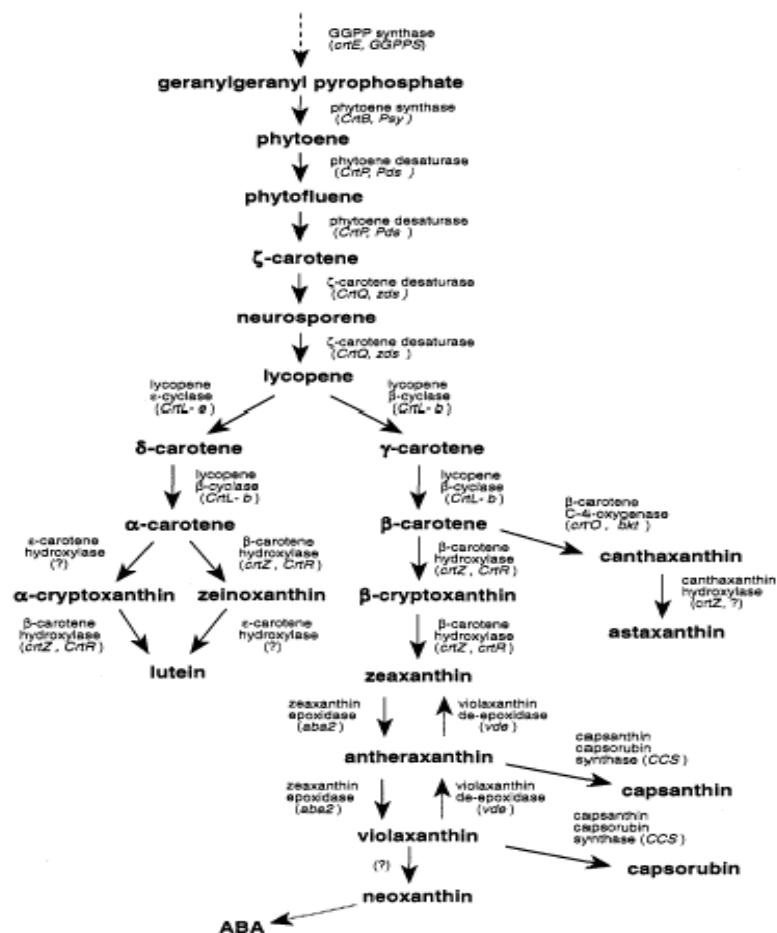
A jelenleg Magyarországon is termesztett, a hazai nemesítésű kenyérbúza fajtákéhoz hasonló hidegtűrésű, valódi őszi durum búzafajták kialakulása interspecifikus hibridizációra vezethető vissza. Az 1930-as években a volt Szovjetunióban elindított programban *Triticum aestivum* fajtákkal létrehozott kombinációkból bőtermő, télálló fajtákat nemesítettek. E program eredményeként született meg a megdőlés-ellenálló, bőtermő Parusz fajta (Dorofejev, 1987), amelyet a legtöbb őszi durum búzanemesítési programban forrásként használtak. A jelenleg elismert hazai, valódi őszi típusú fajták egy része az ebbe a fajtakörbe sorolható források génjeit hordozza (Beke és Matúz 1996, Szunics et al. 1998). Említésre méltó, hogy a szovjet kutatókkal egyidőben, az 1930-as években a magyar Veneny Lajos is végzett hasonló keresztezéseket (Szunics, 1986) azonban e programból termesztett fajta nem született. A számos kedvező irányú változás mellett kedvezőtlen mellékhatásként jelentkezett a durum búzára eredetileg jellemző technológiai minőség megváltozása, ami elsősorban a sárga pigment tartalom csökkenését jelentette.

A sárga pigment

A durum búzából készített száraztészta sárga színének kialakulását két fő tényező befolyásolja: a szemolina genetikailag determinált minősége és a tésztagyártás technológiája. A genetikailag meghatározott tulajdonságok között első helyen található a sárga pigment tartalom (Borrelli et al. 1999), amely különleges szerepet tölt be a durum búza technológiai minősítésében. Dexter és munkatársai (1981) vizsgálatai alapján közvetlen összefüggés sem a

tésztakészítési, sem a főzési tulajdonságokkal nem mutatható ki mégis a tézstaipari felhasználásra termesztett durum búza legfontosabb értékmérője.

A növényekben található pigmentek egyik legfontosabb és legnagyobb számú csoportját alkotják a karotinoidok. Az e csoportba tartozó vegyületek élettani funkciója kettős: 1. fotoszintézis folyamatában a napfény hasznosításának kiegészítő molekulái és 2. a fotooxidatív károsítást gátolják (Demming-Adams et al. 1996). A karotinoidok másik lényeges feladata az idegentermékenyülő növényfajokban a virág színének élénkebbé, attraktívvá tétele a beporzást végző állatok figyelmének felkeltésére. A legtöbb virág és termés narancsszínű, sárga és vörös színeződése a kromoplasztban raktározott karotinoidok miatt alakul ki. A növényi zöld színű szövetek jelentős mennyiségű β -karotint és xanthofilleket (lutein, violaxanthin, neoxanthin) tartalmaznak (Gross 1987 és 1991). Bár a karotinoidok jelenléte a növényi szövetekben már közel egy évszázada ismert (Tswett 1911), mindössze az elmúlt másfél évtized hozott igazi tudományos áttörést a színanyagok bioszintézisének pontos meghatározásában (1. ábra). (Sandman 1994, Armstrong és Hearst 1996).



1. ábra A karotinoid szintézis lépései növényekben (Hirschberg et al. 1997)

A búzában található sárga színanyag kutatása a múlt század első felére nyúlik vissza. Markley és Bailey (1935) a sárga színért felelős molekulák közül legnagyobb jelentőséget a xanthofillnek és észtereinek tulajdonította. Zechmeister és Cholnoky (1940), magyar búzalisztet vizsgálva kizárólag a lutein (xanthofill típusú molekula) jelenlétét mutatta ki. Lepage és Sims (1968) a Mindum kanadai tavaszi durum pigment tartalmát elemezve megállapította, hogy a sárga színanyag 84,8%-át szabad lutein, fennmaradó részét pedig e vegyület észterei alkották.

Az 1. táblázatban van den Berg és munkatársai (2000) közlése, valamint saját méréseink alapján összehasonlításként ismertetjük néhány növényfajban és a durum búza szemtermésében kimutatható lutein mennyiségét.

1. táblázat Különböző növényfajok lutein tartalma

Növényfaj	Lutein, mg/kg
Sárgarépa	0-20,97
Paradicsom	0,44-7,40
Spenót	20,47-203,00
Brokkoli	8,30-43,00
Saláta	0,73-45,37
Őszibarack	0,09-1,20
Durum búza	3,84-10,25

A lutein humán vonatkozásban is jelentős karotinoid származék, melynek az utóbbi időben kiemelkedő jelentőséget tulajdonítanak a táplálkozástudósok. Alves-Rodrigues és Shao (2004) a 173 luteinnel kapcsolatos közlemény alapján elkészített összefoglalója szerint e molekula több ponton fejti ki jótékony hatását az emberi szervezetben. A lutein alapvető összetevője a retina középső területén elhelyezkedő szem sárgafoltjának (*macula lutea*), ahol a zeaxanthinnal együtt elnyeli a szem ideghártyáját károsító kék fényt, és ezzel megakadályozza a szövetek elfajulását, valamint lassítja a szem öregedésével kapcsolatos betegségek (age-related macular degeneration=AMD, szürkehályog) kialakulását. Az érlelmeszesedés folyamatának lassításával hozzájárul a szív egészséges állapotának megőrzéséhez. A bőrben csökkenti az UV sugárzás káros hatását.

A sárga pigment tartalom genetikailag jól determinált tulajdonság. Braaten et al. (1962) a heritabilitási értékszámát 72-96% között, Lee et al. (1976) 79%-ban határozta meg. Johnston et al. (1983) által vizsgált populációk esetén a ugyanez az érték 31 és 69% közötti, azonban a pigment tartalom alapján jobban eltérő szülőkkal létrehozott kombinációknál 66 és 69% volt. Valamennyi fent említett szerző egyetért abban, hogy a sárga pigment tartalmat additív génhatások befolyásolják és már a korai utódgenerációkban sikeresen elvégezhető a

transzgresszív egyedek szelekciója. A nagy heritabilitási értékszám egyben azt is mutatja, hogy a tulajdonság oligogénesen és mindössze néhány allél által determinált. A kezdeti genetikai kutatások eredményei a sárgapigment-tartalmat meghatározó géneket a 2A és a 2B kromoszómán lokalizálták (Joppa és Williams, 1988). Későbbiekben Cenci et al. (2004) e kromoszómákon térképezték a karotinoid bioszintézis korai szakaszában működő ζ-karotin-deszaturáz enzim termelését kódoló szekvenciát. Elouafi et al. (2001) DNS szintű vizsgálata azonban a 7BL és 7AL kromoszómákon mutatott ki a sárgapigment-tartalmat meghatározó régiókat. Kenyérbúzában a 3A és 7A (Parker et al. 1998), illetve a 3B és 7A (Mares és Campbell 2001) kromoszómán azonosítottak a karotinoid-tartalmat befolyásoló QTL-eket (Quantitative trait loci = mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lokuszok). A felsoroltakon kívül a karotinoid bioszintézisben szerepet játszó enzimeket kódoló BAC (bacterial artificial chromosome=mesterséges baktériális kromoszóma) olyan klónokat azonosítottak, melyek a 4A, 4B, 5A és 5B kromoszómákról származó szekvenciákat tartalmazzák. A 4-es kromoszóma csoporton a fitoén-deszaturáz (PDS), míg az 5-ösön a fitoén szintáz (PSY) termelését szabályozó gének lokalizálódnak (Cenci et al 2004). Zhang et al. (2006) a korábban felsoroltak mellett az 1B és a 6A kromoszómán is azonosított a szemolina sárgapigment-tartalmával összefüggő QTL-t. Mint az a felsorolásból kitűnik, szinte valamennyi kromoszómán található olyan DNS szekvencia, amely a karotinoid bioszintézisben működő enzimeket kódol.

Az utóbbi néhány évben a növényi kutatások területén is teret nyertek az új DNS-szintű molekuláris vizsgálati módszerek. A pályázat elkészítésekor még ismeretlen, vagy csak igen szűk körben használt eljárások napjainkra már a mindennapi munka részévé váltak. A mikroszatellit markerek már lehetőséget biztosítanak a keresett tulajdonsággal kapcsoltan öröklődő szekvenciák kromoszómához köthető azonosítására. Az AFLP markerekkel korábban nem tapasztalt mennyiségű polimorfizmus detektálása lehetséges. A különböző kutatóhelyeken létrehozott BAC klónkönyvtárak széleskörűen felhasználhatók a genetikai tulajdonságok vizsgálatára. A létrehozott hatalmas adatbázisok, melyek a világ minden tájáról származó információt szintetizálják kiváló tárházat jelentik az *in silico* kutatásoknak. A tématerv elkészítésekor e módszerek számunkra még elérhetetlenek voltak, így reálisan ezekre nem is alapozhattuk a kutatásainkat. Ezért a durum sárgapigment-tartalmával kapcsoltan öröklődő molekuláris markerek azonosítására az egyesített hasadó utód analízis (bulk segregant analysis, továbbiakban BSA) technikáját választottuk. Michelmore et al. (1991) által kifejlesztett eljárás a kvantitatív öröklődésű genetikai tulajdonságokhoz kapcsolt molekuláris markerek azonosításának gyors és egyszerű módszere. A módszer lényege, hogy a vizsgálat tárgyát képező tulajdonságban egyértelműen eltérő hasadó utódokból két csoportot képzünk: egy nagy és egy kis értékkel jellemezhető. Az e két csoportba sorolt egyedek genetikai anyagát elegyítjük, így csoportonként egy-egy mintát készítünk. Ezután a kiválasztott típusú molekuláris markereket mindössze e két minta vizsgálatával keressük

(Quarrie et al. 1999). Búzában elsősorban különböző kórokozókkal és kártevőkkel szembeni rezisztencia (Hartl et al. 1995, William et al. 1997, Chague et al. 1999, Lazar et al. 1995) és néhány technológiai minőségi tulajdonság molekuláris markerét azonosították (Prasad et al. 1999, Parker et al. 2000).

Közönséges- és durum búzában korábban, vagy a pályázat időszaka alatt több, a sárgapigment-tartalommal kapcsolt molekuláris markert azonosítottak. A témaválasztásunk időszerűségét alátámasztja, hogy ezek többségének közlésére az utóbbi öt évben került sor. A korábban már említett munkájában Parker et al. (1998) a közönséges búza lisztjének színével kapcsolt AFLP markereket azonosítottak, melyeket később a markerszelekcióra alkalmas STS markerré alakítottak át (Parker és Langridge 2000). Santra et al. (2000) durum búzában az UBC 807₁₀₀₀ és az OPK 02₅₃₀ marker és a β -karotin tartalom között mutatott ki korrelációt. Az általuk vizsgált, két tavaszi durum búza szülő keresztezésével előállított populációban a két markerrel a teljes variancia 50,6%-át értelmezték. Elouafi et al. (2001) 114 interspecifikus keresztezésből származó rekombináns beltenyésztett törzs (Recombinant inbred line=RIL) molekuláris elemzésével a 7B kromoszóma hosszú karján található Xgwm344 mikroszatellit és a sárgapigment-tartalom között szoros kapcsoltságot mutattak ki, mellyel a teljes variancia 53%-át tudták magyarázni. A 7A kromoszómán azonosított, valamint két másik, kisebb hatású QTL-lel további 13% és 6%-os hatást számítottak. Hessler et al. (2002) a Jennah Ketifa és a Cham 1 durum búzafajták keresztezéséből származó utódtörzsekben a sárgapigment-tartalom teljes varianciájának 10,4%-át magyarázták az 5A kromoszómára térképezett Xbcd926 RFLP marker jelenlétével. A szemolina színével összefüggő kutatásoknak külön fejezetet szentel a búza markerszelekciójával kapcsolatos eredményeket összesítő honlap, a MASWheat (<http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Color/index.htm>). Az utóbbi években felgyorsult kutatások ellenére, őszi durum búza kombinációk esetén hasonló vizsgálatot tudomásunk szerint még nem végeztek.

Anyag és módszer

Előkísérletek eredménye és a korábbi években elvégzett sárgaindex mérések alapján két, az adott tulajdonságban jelentős mértékben eltérő szülővel – PWD1216 és MvTD10-98 – (2. táblázat) utópopulációt hoztunk létre, melyből a pályázat időtartama alatt 98 kiegyenlített törzset alakítottunk ki. A keresztezést még a pályázat kidolgozásának megkezdése előtt elvégeztük.

2. táblázat. A szülőfajták sárgaindex.

Martonvásár, 1999-2005

Szülő	Törzs	Sárgaindex							
		1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	átlag
Anya	PWD1216	27,41	30,22	25,98	28,04	28,01	29,49	27,40	28,08
Beporzó	MvTD10-98	16,87	21,73	18,46	19,89	20,16	21,19	18,42	19,53

A kombináció F₂ generációjának növényeit üvegházban felneveltük, majd a pályázat éveiben a kalászutódokból kialakított törzseket szántóföldi kísérletbe állítottuk. A növénynevelés célja kizárólag a sárgaindex méréshez szükséges mennyiségű szemtermés előállítása volt. A kísérleti tábla összfel 60+60+60 kg/ha NPK hatóanyagú tápanyag utánpótlást kapott, amit tavasszal további 60kg/ha N fejtrágyával egészítettünk ki. A vetés minden évben október első dekádjában történt. A parcellákat kizárólag a rovarkártevőkkel szemben védtük, fungicides kezelést nem alkalmaztunk. A teljes érést követően a kalászokat kézzel gyűjtöttük be, majd kalászcseplővel csépeztük.

A sárga index méréséhez szükséges szemolína előállításához az MSZ-08-0700-84 szabvány előírásai alapján előkészített, 16%-os nedvességtartalomra kondicionált durum búza mintákat Vasiljevic et al. közlése (1977) nyomán átalakított Brabender Junior labormalmon őröltük. A korpa elválasztását, valamint a szemcseméret szerinti szeparálást az M041623 sz. OTKA Műszerpályázat támogatásával beszerzett Chopin szemolína tisztítóval végeztük. A további vizsgálatokhoz korpaszennyeződéstől mentes frakciót használtuk.

A sárgaindex mérést Minolta CR-300 készülékkel (Minolta Camera Co., Ltd, Osaka, Japan), tristimulusos szín-méréssel végeztük. A készülék 6 szilikon alapú fotocellát tartalmaz, amelyek közül három a kibocsátott, három pedig a visszavert fényt érzékeli és a vörös, zöld, valamint a kék fény primér stimulusát detektálja. A statisztikai számításokhoz a készülék által mért b* értéket használtuk (=sárgaindex). A vizsgálatot három ismétlésben végeztük.

A molekuláris vizsgálatokhoz eredeti tervünk szerint a kombináció F₂ utódait üvegházban elvetettük és a növényekből DNS-t izoláltunk. A több éves szántóföldi kísérletek eredménye alapján azonban a különböző generációk sárgaindexének gyenge összefüggése miatt szükségessé vált a DNS újbóli izolálása, ami F₆ generációban megtörtént. A 2004. és 2005. évi Minolta kromaméterrel elvégzett mérés eredménye alapján kiválasztottuk azt a 10-10 legnagyobb és legkisebb sárgaindexű utódot, melyek mindkét évben szélsőséges értékűek voltak. Ezek DNS-ét elegyítve két bulk DNS mintát alakítottunk ki és a továbbiakban e két minta felhasználásával kerestük a polimorfizmust mutató DNS szakaszokat RAPD technikával. A polimorfizmust mutató markereket először a bulk minták összetevőivel teszteltük, majd a sárgaindexszel kapcsoltan szegregálókat a szülőfajtákkal együtt összesen 100 genotípuson teszteltük.

A DNS izolálást az F₂ generációból Ravenel Specialities (Seneca, SC, USA) extraktorral, CTAB módszerrel, az F₆ generációból Qiagene DNEasy Plant Mini[®] DNS izoláló kittel végeztük. Az izolált DNS-oldatok koncentrációját Hofer gyártmányú TKO 100 Mini-Fluorometerrel (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA) határoztuk meg.

A specifikus termékek felszaporítása PTC-100 (MJ Research, Waltham, MS, USA) típusú PCR készüléken történt. A laboratóriumi kísérletekben 520 Operon primert használtunk (OPA-OPZ sorozat).

A reakciós elegy összetétele egy reakcióra számolva:

Master mix:	
- steril MilliQ víz	13,00µl
- puffer	4,40µl
- MgCl ₂	2,00µl
- dNTP	0,16µl
- primer	2,50µl
- Taq-polimeráz	0,14µl

A PCR reakcióhoz a következő keveréket használtuk:

Master mixből	19,5µl
DNS	2,5µl

A reakciós elegyet egy csepp ásványolajjal lefedtük és elindítottuk PCR programot (94°C 1'; 36°C 1'; 72°C 1' 36 cikluson keresztül; 72°C 6'). Az amplifikált produktumokat 1,2%-os agaróz gélen elektroforézissel választottuk szét és etidium-bromidos festéssel tettük láthatóvá az egyes sávokat. A mikroszatellit és AFLP markereket Li-Cor 4300 DNA Analyzer készülékkel detektáltuk.

A sárgaindex adatok statisztikai kiértékelését kéttényezős varianciaanalízissel (Breeder programcsomag/Statistics modul, MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár), a technológiai és a markeres adatok összehasonlítását Statistica 6.0 szoftverrel (StatSoft, Tulsa, OK, USA) végeztük. A többváltozós elemzésekhez a két évben mért adatok átlagértékeit használtuk.

Eredmények

Sárgaindex technológia vizsgálata

Három egymást követő évben (2003-2005) szántóföldi kísérletbe elvetettük a PWD1206/MvTD10-98 keresztezési kombinációból létrehozott törzseket. A három esztendő időjárása jelentősen különbözött. A 2002/2003 tenyészidőszak sokáig emlékezetes marad a gabonatermesztők számára, hiszen a szokatlanul hideg telet követően a korai felmelegedés, majd rendkívüli aszály sanyargatta a növényállományokat. A rendkívüli körülmények miatt szerencsésnek mondható, hogy a következő évi kísérlet beállításához elegendő vetőmagot tudtunk felszaporítani. Az állomány hiányosan telet át, sok törzsből mindössze néhány egyed élte túl a telet. A megmaradt törzsek minőségvizsgálatát elvégeztük, de a kapott eredmények irreálisnak bizonyultak, így a 2003. évi eredményeket nem tudtuk felhasználni statisztikai elemzésre. A 2003/2004. évi tenyészidőszak gyökeres ellentéte volt az ezt megelőzőnek. Az időjárás, mintha csak kárpótolni akarná a gabonatermesztőket, a durum búza fejlődéséhez optimális körülményeket biztosított. Az átlagos telet követően a vegetációs időszakban sok csapadék hullott, de az érés során már kevesebb eső esett. A 2004. év az utóbbi 15 évben rekordnak számító búza termésmennyiségéről marad emlékezetes. Kísérletünk növényei is az

optimális körülmények között, megfelelő fejlettségűek és egészségesek voltak, így a termésből elvégezhetjük a sárgaindex mérést. A 2005. esztendő az előzőhöz hasonlóan indult, azonban a közvetlenül aratás előtt beköszöntő csapadékos időjárás jelentősen rontotta a búza és a durum búza termésével kapcsolatos várakozásokat. Kísérletünket sikeresen learattuk, a sárgaindex mérés a törzsek terméséből megtörtént. Így a statisztikai értékeléshez két tenyésztési évi adatát (2004. és 2005. év) használtuk fel. Az adatok leíró statisztikáját a 3. táblázatban mutatjuk be.

3. táblázat Őszi durum búzatörzsek évenkénti leíró statisztikája
Martonvásár, 2004-2005

Tulajdonság	2004	2005	2004-2005 átlagok
Várható érték	25,53	22,07	23,80
Minimum	21,19	16,66	18,94
Maximum	29,88	27,74	28,63
Szórás	1,87	2,24	2,01

A törzsek sárgaindexének átlaga 2004-ben közel 3,5-del haladta meg a 2005. évit, ami főként a betakarítást megelőzően lehullott nagy mennyiségű eső következménye. A kedvezőtlen időjárás különösen a kisebb sárgaindexű törzseket károsította, hiszen a legkisebb érték 2005-ben mindössze 78%-a volt a 2004. évinek, ugyanakkor a maximum értékeknél a csökkenés csak 8%-ot ért el.

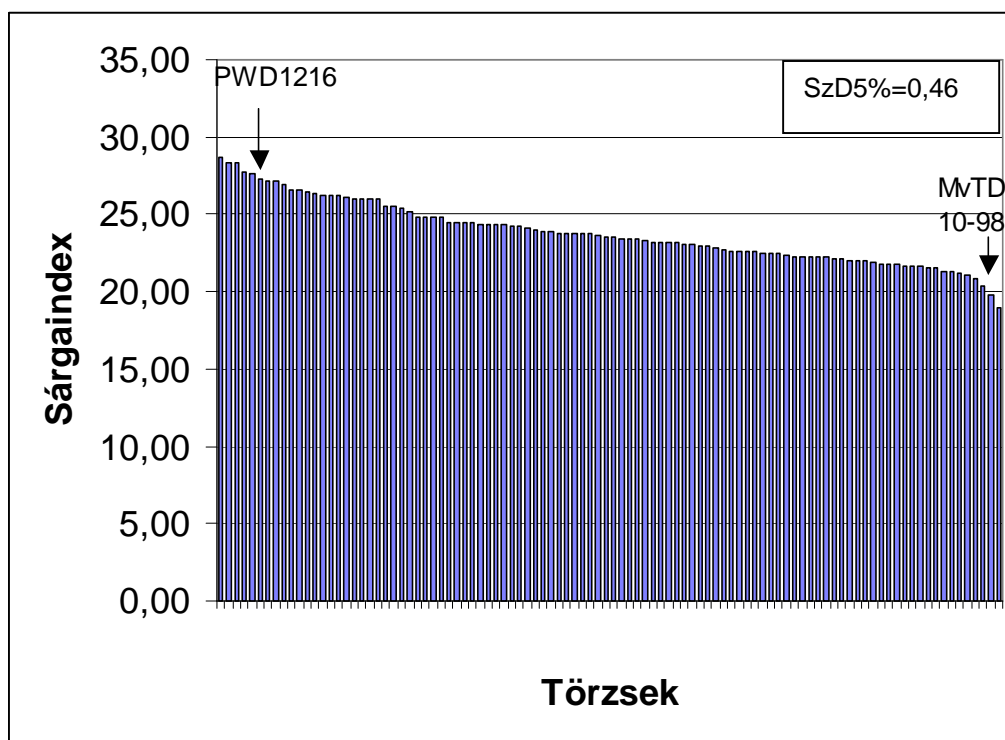
Az adatok feldolgozását kéttényezős varianciaanalízissel végeztük, melyben az „A” tényezőt a törzsek, a „B” tényezőt az évek jelentették. A számítás eredményét a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat Őszi durum búzatörzsek sárgaindexének varianciaanalízise
Martonvásár 2004-2005

Tényező	SQ	Fg	MQ	F
Összes	4397,03	599		
Törzs	2397,46	99	24,22	147,11***
Évjárat	1796,47	1	1796,47	10912,79***
Törzs×Évjárat	137,25	99	1,39	8,42***
Hiba	65,85	400	0,16	

A varianciaanalízis eredménye szerint a törzsek az évjáratok, valamint a két tényező kölcsönhatása is szignifikánsnak bizonyult. Azonban megállapítható, hogy a kölcsönhatás teljes varianciához való hozzájárulása jóval gyengébb a másik két tényezőénél.

A vizsgált őszi durum búzatörzsek két évben mért átlagértékeit a 2. ábrán szemléltetjük. Az ábrán a szülők adatait is feltüntettük.



2. ábra Őszi durum búzatörzsek sárgaindex
Martonvásár, 2004-2005 átlaga

A 100 vizsgált törzs átlagos sárgaindex adatai megfelelnek a normál eloszlás feltételének, amit a Kolmogorov-Szmirnov teszt eredménye is bizonyított ($d=0,076^{ns}$). Mint az ábráról leolvasható, a két szülő adatainak eltérése többszörösen meghaladja az $SzD_{5\%}$ értékét. A vizsgált törzsek eloszlásuk és az adatok között megfigyelhető különbségek alapján alkalmasnak bizonyultak a molekuláris vizsgálatok elvégzésére.

RAPD markeres vizsgálatok

BSA módszerrel a sárgaindex tartalommal összefüggő molekuláris markereket azonosítottunk. A bulk mintákhoz 10-10 nagy, illetve kis sárgaindexű törzset választottunk ki. A továbbiakban vizsgált őszi durum búzatörzsek sárgaindex adatait az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat Az egyesített DNS mintákhoz kiválasztott törzsek sárgaindex

Nagy sárgaindexű bulk			Kis sárgaindexű bulk		
	Sárgaindex		Sorszám	Sárgaindex	
Sorszám	2004	2005		2004	2005
8	28,55	26,89	51	23,62	19,46
12	28,72	25,17	56	21,23	16,66
18	27,19	27,11	80	23,79	19,17
29	29,88	27,40	105	23,59	19,03
30	28,99	27,74	147	23,29	19,20
33	27,80	27,47	201	23,66	18,40
45	30,07	26,28	212	23,31	18,46
46	29,78	26,91	216	22,47	19,72
47	28,99	25,43	220	23,45	19,21
155	28,28	26,09	228	22,00	18,74

A molekuláris marker azonosításhoz 520 RAPD primert használtunk. A bulk minták között egyértelmű különbséget egyetlen esetben sem kaptunk, mindössze intenzitásban megfigyelhető eltéréseket tapasztaltunk. A bulkokat alkotó egyedi törzsek tesztelését követően 5 primerrel 9 polimorf markert azonosítottunk. E markerek hasadási arányát a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat Polimorf RAPD markerek hasadása a szélsőségesen nagy, vagy kis sárgaindexű őszi durum törzsekben

Marker	Nagy:kicsi hasadási arány
OPA16-800	7:3
OPD18-300	később azonosítva
OPD18-500	2:5
OPK18-320	7:2
OPK18-450	6:9
OPK18-620	4:4
OPT16-980	7:3
OPT16-920	2:6
OPZ17-1500	6:1

A bulk összetevőinek vizsgálatok a túlságosan hosszú futtatási idő miatt az OPD primerrel kimutatható mindössze 300 bp-nyi kis terméket nem tudtuk megfigyelni. A teljes populáció vizsgálatok azonban egyértelműen kimutatható volt a jelenléte a vizsgált genotípusokban. Santra et al. (2000) által közölt OPK02 primer az általunk vizsgált szülőkből monomorfnak bizonyult, így a további tesztelésekből kizártuk.

A továbbiakban a 98 utódtörzs és a két szülő, azaz összesen 100 törzs DNS-ének felhasználásával vizsgáltuk a populációban a markerek jelenlétét. A kapott eredményt korrelációanalízissel megállapítottuk a markerek és a két évben mért sárgaindex adatok átlagértékeinek kapcsoltságát. A korrelációs koefficiens értékét a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat RAPD markerek összefüggése a két évben mért sárgaindex adatok átlagával Martonvásár, 2005

Marker	r	R ²
OPA16-800	0,41*	0,17
OPD18-300	-0,29*	0,08
OPD18-500	0,06	0,00
OPK18-320	0,10	0,01
OPK18-450	-0,18	-0,03
OPK18-620	0,05	0,00
OPT16-980	0,12	0,01
OPT16-920	-0,21*	-0,04
OPZ17-1500	0,36*	0,13

*= a korrelációs koefficiens $p < 0,05$ szinten szignifikáns

A vizsgált 9 marker közül 4 szignifikánsan korrelált a sárga indexszel. A „r” értékek nagysága és előjele a bulk összetevők vizsgálatával összhangban a várakozásoknak megfelelő volt. A legszorosabb összefüggést az OPA16-800 markerrel mutattuk ki, amellyel önmagában a sárgaindex varianciájának 17%-át tudtuk magyarázni. A 0,36-os korrelációs koefficienssel az OPZ17-1500 volt a második legszorosabban kapcsolt marker.

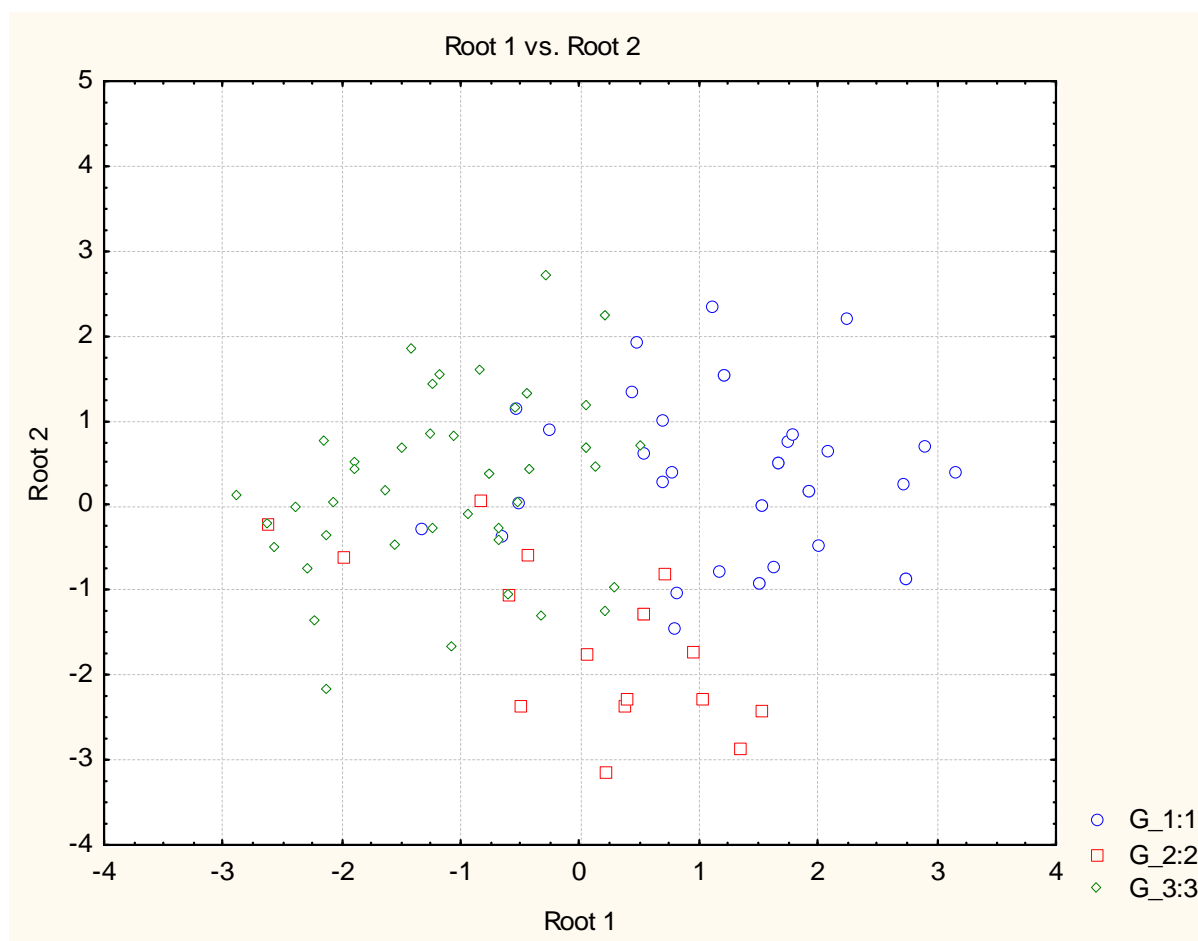
Valamennyi markert együttesen figyelembe véve többszörös regresszióval is elemeztük adatainkat. Az e módszerrel számított többszörös korrelációs koefficiens értéke (R) 0,6485 volt, a többszörös determinációs koefficiens (R^2) 0,4205-re nőtt, azaz a 9 markerrel a rendszer varianciájának jelentős hányadát tudtuk magyarázni. A többszörös regresszióval az egyes markerek közül az OPA16-800, OPD18-300, OPK18-320 és a Z17-1500 markerek korrelációját bizonyítottuk. Amennyiben csak a felsorolt 4 markert vontuk be az elemzésbe még mindig $R=0,6485$ és $R^2=0,3773$ értékeket számítottunk.

A továbbiakban diszkriminancia analízissel vizsgáltuk a sárgaindex alapján történő csoportosítás helyességét. A vizsgált törzseket sárgaindexük alapján három csoportba soroltuk. Az első csoportba kerültek azok a törzsek, melyek sárgaindexük pozitív irányban szignifikánsan eltért a populáció átlagától (37db), másodikba azok, melyek statisztikailag az átlaggal megegyező értékűek voltak (17 db), míg a harmadikba az átlagnál szignifikánsan kisebb sárgaindexű törzseket soroltuk (46db). A számításokat a 9 markerrel együttesen, illetve a többszörös regresszióval azonosított szignifikánsan korreláló 4 markerrel külön is elvégeztük. A csoportosítás eredményét a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat A sárgaindex alapján csoportosított törzsek besorolásának ellenőrzése a RAPD markeres adatok diszkriminancia analízisével
Martonvásár, 2005

	Csoport	Feltételezett csoportosítás							
		9 marker alapján				4 marker alapján			
		Egyező %	1	2	3	Egyező %	1	2	3
Számított csoportosítás	1	83,78	31	1	5	78,37	29	2	6
	2	64,71	1	11	5	29,47	6	5	6
	3	82,61	3	5	38	93,47	3	0	43
	Összes	80,00	35	17	48	77,00	38	7	55

A diszkriminancia analízis eredménye alapján a 9 markerrel a törzsek 80%-a helyesen sorolható be a megfelelő sárgaindexű csoportba. Ha mindössze a 4 legszorosabban kapcsolt markert használjuk az elemzésnél a helyes csoportba sorolás aránya 77%-ra csökken, azonban a kis sárgaindexű csoportban ez az arány 93,47%-ra nő. Ez azt jelenti, hogy e 4 RAPD markerrel a rossz technológiai minőségű törzsek nagy valószínűséggel azonosíthatók. A csoportokat grafikusán ábrázolva az első és második kanonikus változó függvényében a három csoport egymástól jól elkülöníthető



3. ábra Az őszi durum búzatörzsek csoportosítása diszkriminancia analízissel,
9 marker alapján

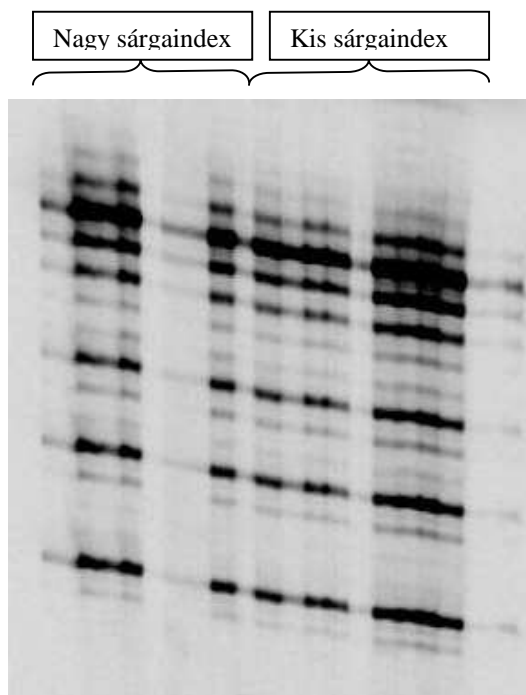
Martonvásár, 2005

Egyéb molekuláris vizsgálatok

A pályázat elindulása óta bekövetkezett változások a molekuláris laboratóriumunkban lehetővé tette munkánk kibővítését. A Li-Cor 4300 DNA Analyzer készülékkel vizsgáltuk a bulk mintákat alkotó törzsek összefüggését az irodalomban leközölt, mindeddig a legszorosabb kapcsoltságot mutató Xgwm344 jelenlétére, valamint teszteltük az AFLP módszer alkalmazhatóságát.

Az Xgwm344 marker, mint az a 4. ábrán látható, törzseink esetén nem mutatott polimorfizmust, így sajnos a mi kombinációnkban nem bizonyult alkalmasnak a sárgaindex alapján végzett markerszelekció céljára. Mivel a 7B kromoszóma hosszú karján található marker nem adott kapcsoltságot a sárgaindexszel, néhány újabb, más kromoszómán lokalizált markert is bevontunk a vizsgálatokba. A 33 marker közül ezidáig az Xgwm135 adta a legkedvezőbb hasadási arányt, a nagy sárgaindexű törzsekben 8:2, a kicsikben 4:6 arányt

figyeltünk meg. Irodalmi adatok szerint (Röder et al. 1998) ez a marker az 1A kromoszómán található.

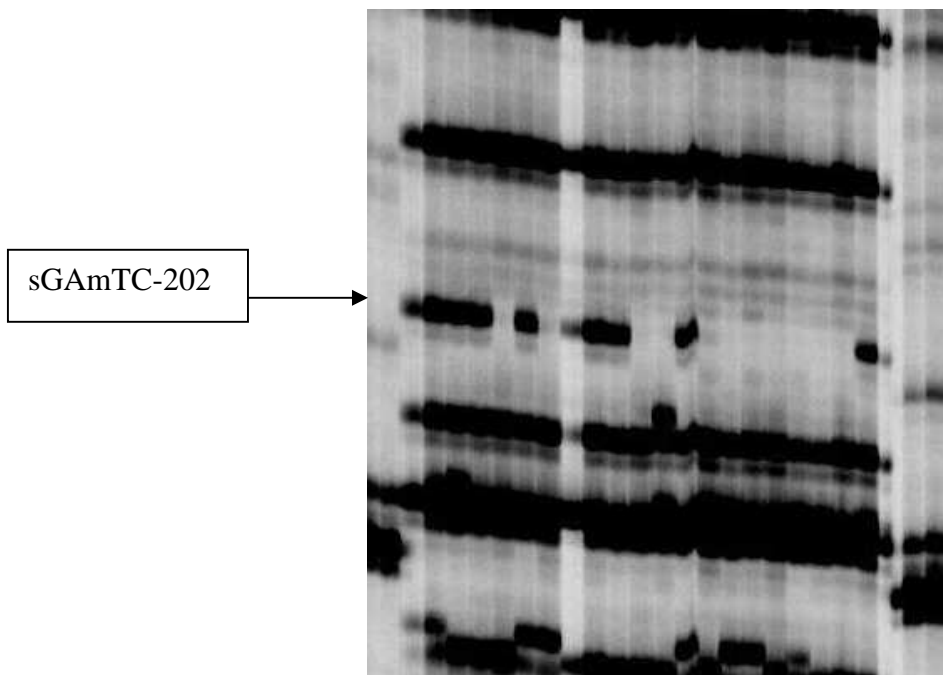


4. ábra Az Xgwm344 marker kimutatása őszi durum búzatörzsekben

Mivel az AFLP vizsgálatok csak rövid ideje indultak meg laboratóriumunkban, így csak egyetlen szelektív primerpár vizsgálatára volt lehetőségünk. A kapott eredmény biztató, hiszen már az első futtatás során 15 polimorfizmust azonosítottunk. Adatainkat a 9. táblázatban összegezzük, a gél fotója pedig az 5. ábrán látható. Az sGAmTC-202 markerrel 7:2 hasadási arányt mutattunk ki, ami alapján már e markert a teljes populáció tesztelésére is érdemes lenne felhasználni.

9. táblázat DNS szintű polimorfizmusok azonosítása AFLP módszerrel
őszi durum búzatörzsekben
Martonvásár, 2005

	PWD 1216	MvTD 10-98	Nagy bulk								Kis bulk								
			8	12	18	29	30	33	45	46	47	51	56	80	105	147	201	212	216
sGAmTC-25	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0
sGAmTC-110	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
sGAmTC-130	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
sGAmTC-148	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
sGAmTC-168	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
sGAmTC-172	0	1	0	0	1	0	0		0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
sGAmTC-182/180	182	180	180	180	180	182	182	180	180	180	180	182	180	182	182	180	182	180	180
sGAmTC-202	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
sGAmTC-222	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
sGAmTC-240	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
sGAmTC-260/266	260	266	266	260	260	266	260	266	266	260	260	260	266	260	260	260	260	266	260
sGAmTC-420	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
sGAmTC-480	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
sGAmTC-500/492	500	492	492	492	500	500	500	492	492	500	492	492	492	500	500	492	500	500	492
sGAmTC-505	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1



5. ábra AFLP polimorfizmus kimutatása az sGAmTC specifikus primerpárral
Martonvásár, 2005

Összefoglalás

Az OTKA T038044 pályázat támogatásával az elmúlt négy évben új területen kezdtük meg a kutatást. A molekuláris markerszelekció bevezetésének lehetősége a durum búza beltartalmi tulajdonságait javító nemesítésébe vizsgálataink nyomán kézzel fogható közelségbe került. Az elért eredmények összhangban állnak az előzetesen eltervezett célkitűzésekkel, a PWD1216/MvTD1098 kombináció utódtörzseiből az azonosított markerek együttes használatával nagy biztonsággal választható ki a nagy, és még ennél is hatékonyabban a kis sárgaindexű utódtörzs. Mindazonáltal a négy év munkáját követően meg kell állapítanunk, hogy ez még csak a kezdeti, bár igen fontos lépés e területen. A marker- és laborotechnika fejlődésével új perspektívák nyílnak a molekuláris markerszelekció hatékonyabb alkalmazására és bevezetésére a mindennapi gyakorlatba. A mikroszatellit és az AFLP technika már elérhető és a kommunikációs forradalom révén szinte azonnal hozzáférhetők más kutatócsoportok eredményei a központi adatbázisokon keresztül, melyek továbbfejlesztve és a helyi lehetőségekhez adaptálva szolgálhatják a hazai kutatásokat.

A közvetlenül a pályázat témájához kötődő eredményeken (azonosított markerek) túl a pályázat áttételesen hozzájárult a kutatási háttér technológia színvonalának javításához. A jelenlegi OTKA pályázat megjelölésével benyújtott Műszerpályázat keretében (M041623) szemolina tisztítót szereztünk be, mellyel nagy tisztaságú, a technológia vizsgálatokra kiválóan alkalmas durum őrlemény állítható elő. Több egyéb pályázat mellett az OTKA T038044 is szerepelt abban az OM-KMA pályázatban, melynek elnyerése után megvásároltuk

a Li-Cor 4300 DNA Analyzer készüléket, amivel a mikroszatellit és az AFLP vizsgálatok pontosan elvégezhetőek. Végül ezen OTKA pályázat biztosította az anyagi háttérrel ahhoz a munkához, amit a témavezető egy Bolyai János Kutatási Ösztöndíj keretében végzett.

E pályázat közvetett eredménye az is, hogy az eltelt évek alatt létrehoztunk egy olyan, őszi durum búza törzsekből álló populációt, ami a későbbiekben más agronómia és technológia minőségi tulajdonságok tanulmányozására és térképezésére is használható. A két szülő ugyanis nemcsak a sárgaindexben különbözik egymástól, rendkívül eltérőek a sikerminőségi tulajdonságaik, hidegtűrésük, kalásztípusuk, hogy csak az eddig vizsgált tulajdonságokat soroljuk.

Végezetül, bízva abban, hogy a megkezdett téma folytatásához a későbbiekben sikerül újabb forrásokhoz jutnunk és munkánkat tovább folytatni, ezúton is köszönjük az OTKA anyagi támogatását.

2006. február 27.

Vida Gyula

témavezető

Irodalomjegyzék

- Alves-Rodrigues, A., Shao A. (2004): The science behind lutein. *Toxicology letters* 150: 57-83.
- Armstrong, G.A., Hearst, J.E. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228-237.
- Beke B., Matuz J. (1996): Breeding of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) in Szeged, Hungary. *Cereal Res Commun*, 24: 49-52.
- Borrelli, G.M., Troccoli, A., Di Fonzo, N., Fares, C. (1999): Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. *Cereal Chem*, 76: 335-340.
- Bozzini, A. (1988): Origin, distribution and production of durum wheat in the world. In: Fabriani, A. C. Lintas (eds.) *Durum wheat Chemistry and technology*. pp. 1-16. AACCC, St. Paul, MN, USA.
- Braaten, M.O., Lebsock, K.L., Sibbit, L.D. (1962): Intergeneration relations of physical properties of dough and carotenoid pigment content in durum wheat. *Crop Sci*, 2: 277-281.
- Cenci, A., Somma, S., Chantret, N., Dubcovsky, J., Blanco, A. (2004): PCR identification of durum wheat BAC clones containing genes coding for carotenoid biosynthesis Enzymes and their chromosome localization. *Genome* 47: 911-917.
- Chague, V., Fahima, T., Dahan, A., Sun, G.L., Korol, A.B., Ronin, Y.I., Grama, A., Roder, M.S., Nevo, E. (1999): Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Yr15 gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. *Genome*, 42: 1050-1056.
- Demming-Adams, B. A.M. Gilmore, W.W. Adams (1996): In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10: 403-412.
- Dexter J.E., Matsuo, R.R., Preston, K.R., Morgan, B.C. (1981): Comparison of gluten strength, mixing properties, baking quality and spaghetti quality of some Canadian durum and common wheats. *Can Inst Food Sci Technol J*, 14: 108-111.
- Dorofejev, V.F. (ed, 1987): *Psenyicü mira*. VO Agropromizdat, Leningrád.
- Elouafi I., Nachit, M.M., Martin, L.M., Hernandez, P (2001): Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Hereditas* 135, 2-3: 255-261.
- Gross, J. (1987): *Pigments in fruits*. Academic Press, London.

- Gross, J. (1991): Pigments in vegetables. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hartl, L., Weiss, H., Stephan, U., Zeller, F.J., Jahoor, A. (1995): Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 90: 601-606.
- Hessler, T.G., Thomson, M.J., Benscher, D., Nachit, M.M., Sorrells, E. (2002): Association of a lipoxygenase locus, Lpx-B1, with variation in lipoxygenase activity in durum wheat seeds. *Crop Sci*. 42: 1695-1700.
- Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann, V., Pecker, I. (1997): Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure & Appl. Chem*. 69(10): 2151-2158.
- Johnston, R.A., Quick, J.S., Hammond, J.J. (1983): Inheritance of semolina color in six durum wheat crosses. *Crop Sci*, 23: 607-610.
- Joppa, L.R., Williams, N.D. (1988): Genetics and breeding of durum wheat in the United States. In: Fabriani, A. C. Lintas (eds.) *Durum wheat chemistry and technology*. pp. 47-68. AACC, St. Paul, MN, USA.
- Lazar, M.D., Peterson, G.L., Hu, J. (1995): Multigenic inheritance of biotype-E greenbug resistance in wheat. *Plant Breeding*, 114: 492-496.
- Lee, J., Kaltsikes, P.J., Bushuk, W. (1976): The inheritance of lipoxidase activity and pigment content in durum wheat. *Theor Appl Genet*, 47: 243-250.
- Lepage, M., Sims, P.A. (1968): Carotenoids of wheat flour: their identification and composition. *Cereal Chem*, 45: 600-604.
- Mares, D.J., Campbell, A.W. (2001): Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1297-1309.
- Markley, M.C., Bailey, C.H. (1935): The nature of the pigments of the gasoline extracts of the wheat. *Cereal Chem*, 12: 33-39.
- Michelmore R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. (1991): Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 9828-9838.
- Parker G.D., Chalmers, K.J., Rathjen, A.J., Langridge, P. (1998): Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 97: 238-245.
- Parker G.D., Chalmers, K.J., Rathjen, A.J., Langridge, P. (2000): Mapping a loci associated with milling yield in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breeding*, 5: 561-568.
- Parker G.D., Langridge, P. (2000): Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding* 6(2): 169-174.
- Parker, G.D., Chalmers, K.J., Rathjen, A.J., Langridge, P (1998): Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 97: 238-345.
- Prasad, M., Varshney, R.K., Kumar, A., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Edwards, K.J., Singh, H., Dhaliwal, H.S., Roy, J.K., Gupta, P.K. (1999): A microsatellite marker associated with a QTL for grain protein content on chromosome arm 2DL of bread wheat. *Theor Appl Genet*, 99:341-345.
- Quarrie S.A., Lazic-Jancic, V., Kovacevic, D., Steed, A., Pekic, S.(1999): Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J Exp Botany*, 50: 1299-1306.
- Sandmann, G. (1994): Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem* 1994 223: 7-24.
- Santra, M.D., Tamhankar, S.A., Degaonkar, A.M., Rao, V.S., Gupta, V.S. Ranjekar, P.K. (2000): Identification of molecular markers associated with β -carotene content and grain weight in durum wheat. Abstracts of 6th International Wheat Conference, 5-9 June 2000, Budapest, Hungary. 151.
- Szunics L.(1986): A durum búza Magyarországon a hazai szakirodalom tükrében. *Növénytermelés*, 35, 3, 259-267.
- Szunics l., Bedő Z., Szunics Lu., Láng L., Veisz O. (1998): Results of durum wheat breeding in Martonvásár. *Acta Agronomica Hungarica*, 46: 135-148.
- Tswett, M. (1911): Über den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. *Berl. Dtsch.Bot. Ges.* 29: 630-636.
- van den Berg, H. Faulks, R., Fernando Granado, H., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., Stahl, W. (2000): The potential for the improvement of carotenoid levels in food and the likely systemic effects. *J Sci Food Agric*, 80: 880-912.
- Vasiljevic S., Banasik, O.J., Shuey, W.C. (1977): A micro unit for producing durum semolina. *Cereal Chem*, 54: 397-404.
- William, H.M., Hoisington, D., Singh, R.P., Gonzalez de Leon, D. (1997): Detection of quantitative trait loci associated with leaf rust resistance in bread wheat. *Genome*, 40: 253-260.
- Zechmeister L., Cholnoky L. (1940): Carotenoids of Hungarian wheat flour. *J Biol Chem*, 135: 31-36.
- Zhang, W., Chao, S., Manthey, F., Carrera, A., Echenique, V., Cervigni, G., Helguera, M., Dubcovsky, J. (2006): QTLs mapping for semolina and pasta color in durum wheat. Abstract, Plant & Animal Genomes XIV. Conference, January 14-18, 2006, San Diego, CA, USA. 321.