

Dohánynemesítés másként:
Gyomirtószer ellenálló vonalak szelekciója csíranövényeken

Gondola István
2020

Bevezetés

A dohányfojtó szádor jelenléte és kártétele végigkíséri a magyarországi dohánytermesztés történetét. Hatékony védekezés e gyökérparazita ellen soha nem állt rendelkezésre és ma sincs (1. ábra).



1. ábra Dohányfojtó szádortól sújtott dohányültetvény Kunadacs határában

Gyomirtószer rezisztens dohányfajták termesztése a szádor elleni védekezés kézenfekvő módja. Ezt szem előtt tartva a klórszulfuron herbiciddel szemben ellenálló dohányvonalakat hoztunk létre a 2000-es évek elején a debreceni Dohánykutató Intézet Rt. Agrotab Kft-jében. A rezisztens fajtát és a szántóföldi védekezőtechnológiát 2003-2004-ben teszteltük kisparcellás és félüzemi kísérletekben (1). Jelen tanulmányban ismertetem a gyomirtószer ellenállóságra irányuló szelekció eddig nem közölt részleteit.

Az alapok

A szádor elleni hatékony védekezés alapja a gyomirtószerrel szemben ellenálló gazdanövény. Az alapelv: a rezisztens gazdanövény leveleire juttatott gyomirtószer szisztemizálódik a növényben, majd a gyökéren át a nem rezisztens parazitába jut és elpusztítja azt. A gazdanövény nem károsodik a kezeléstől.

A klórszulfuron első generációs szulfonilkarbamid herbicid. A vele szemben kialakított rezisztencia genetikai hátterét korábbi munkámban ismertettem (2). E helyen csak utalok arra, hogy az ellenállóságot a növényben egyetlen gén, az acetolaktát-szintetáz enzimet kódoló ALS

gén mutáns változata biztosítja. A mutáció által nyújtott herbicid ellenállóság öröklődése egygénese, az öröklésmenet szemidomináns.

A klórszulfuron és a többi szulfonilurea hatóanyag oly módon fejti ki gyomirtó hatását, hogy gátolja az acetolaktát szintetáz enzim működését. Ennek révén nem képződnek elágazó szénláncú aminosavak (leucin, izoleucin, valin), így kárt szenved a fehérjeszintézis. A mutáns gén által kódolt ALS enzimet viszont nem képes gátolni a gyomirtószer, mert nem tud kapcsolódni hozzá.

Első lépésben létrehoztuk a mutáns ALS gént egy-egy Virginia és Burley vonalban az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközponttal együttműködve. Ennek módja: szelektív, vagyis klórszulfuront tartalmazó táptalajon a mutáns génekre (sejtekre) *in vitro* szelekciót végeztünk. A sejtenyészetben szelektálódott – az ALS génre heterozigóta – mutáns sejtekből teljes növényt regeneráltunk. A második lépésben az ALS génre heterozigóta kiindulási vonalakat homozigótává tettük a rezisztencia stabilizálása céljából.

A homozigóta változat előállítását az indokolja, hogy a heterozigóta állapot nem nyújt kellő ellenállóságot a gyomirtószerrel szemben (heterozigóta állapotban a mutáns gént az adott génlókuszon csak az egyik allél hordozza). Csakis a homozigóta forma biztosít kellő szintű szántóföldi ellenállóságot a herbiciddel szemben (homozigóta állapotban mindkét allél mutáns, vagyis rezisztens).

Mint lentebb látni fogjuk, a heterozigóta növény

- a gyomirtószerrel szemben „félrezisztensnek” tekinthető (ez a szemidomináns öröklésmenetből adódik), továbbá
- a fajtafenntartás során problémát okoz, hogy öntermékenyítéskor az ALS génre nézve hasad, vagyis különböző rezisztencia szintű formák jelennek meg az utódnemzedékben.

Ezzel szemben a fenti génre homozigóta állomány genetikailag stabil, a herbicidrezisztencia pedig magas szintű, teljes értékű.

Az első lépésben rezisztenssé tett fenti két vonal nem szerepelt termesztésben, viszont köztermesztésű F₁ hibridek előállításához keresztezési partnerként szolgált. E két vonalat felhasználva átvittük a mutáns ALS gént a rendelkezésre álló dohányvonalak – többnyire hibrid keresztezési partnerek – szélesebb körébe back-cross módszerrel.

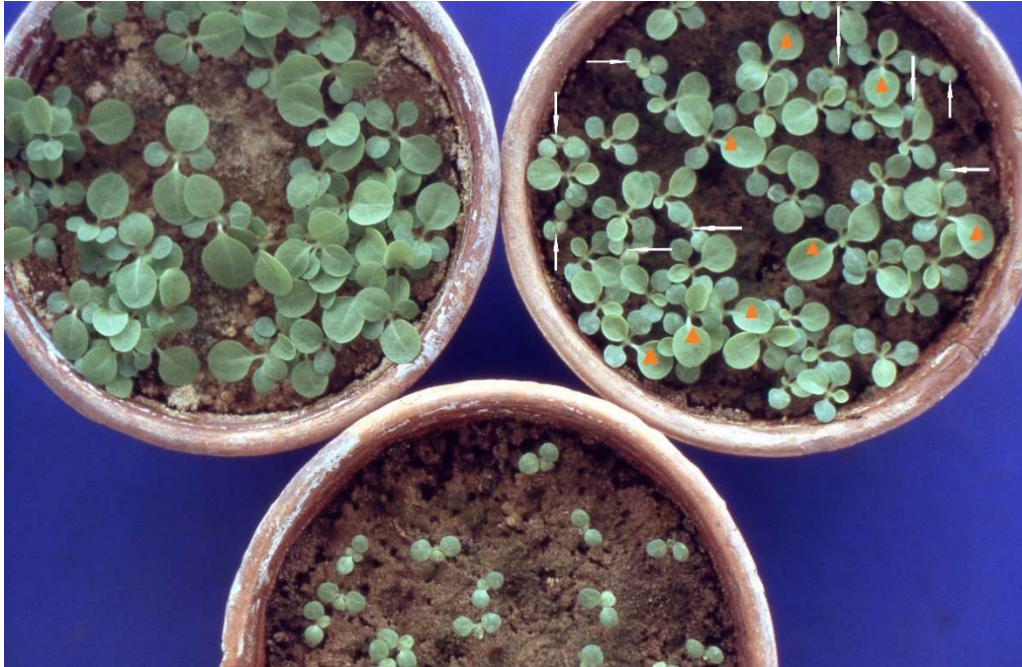
A munka során minden egyes utódnemzedékben csíranövény szelekciót folytattunk a herbicidellenállóságra. A növényeket az e célra korábban kidolgozott protokoll szerint készítettük elő a kezeléshez. A kezelés során a klórszulfuron megfelelő töménységű és mennyiségű oldatát a megfelelő módon a levélre juttattuk. A kellő szelekciós nyomás érdekében az itt használt dózis sokszorosa a szántóföldi dózishoz (növényi szárazanyagra vetítve).



2. ábra Klórszulfuron oldattal frissen permetezett csíranövény állomány

Genetikai hasadás a rezisztenciára

Az ALS gén hasadására példaként álljon itt a 2002-ben létrehozott heterozigóta Virginia mutáns genetikai elemzése (3. ábra).



3. ábra Az ALS génre heterozigóta Virginia egyed öntermékenyítéséből származó nemzedék hasadási aránya a klórszulfuron rezisztenciára 1:2:1

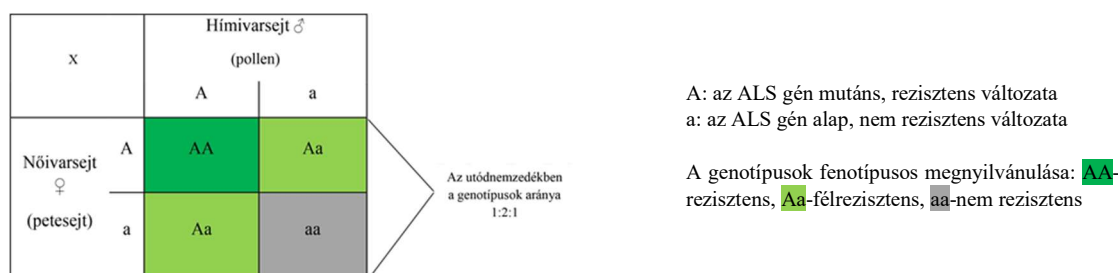
Vetés: 2002. november 13.
Kezelés: 2002. november 26.
Felvétel: 2002. december 02.

A jobb felső cserépben az ALS génre történő hasadást látjuk a heterozigóta szülői egyed öntermékenyítéséből származó nemzedékben, mindössze hat nappal a klórszulfuron kezelés után. A másik két cserépben ugyanezen Virginia vonal eredeti, nem mutáns vagyis herbicidérzékeny változata látható. A bal felső a kezeletlen, az alsó pedig kezelt, ugyanazzal a dózissal és ugyanabban az időpontban, mint a jobb felső mutáns.

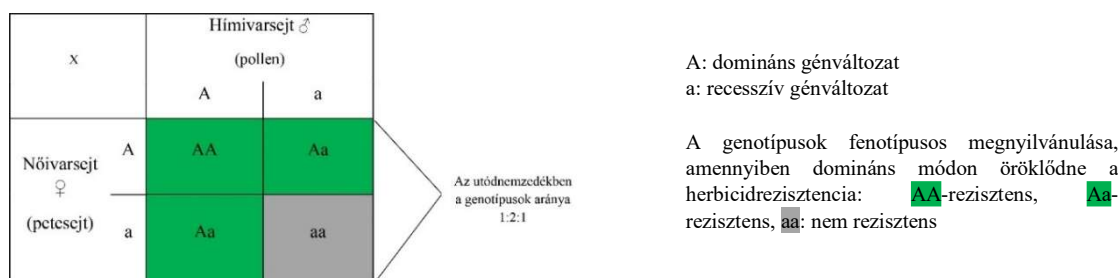
Bár hat nappal a kezelés után még enyhék a tünetek, már teljes bizonyossággal megállapítható a mendeli szabályok szerinti hasadás a rezisztenciára (jobb felső cserép). A megközelítőleg 1:2:1 arányban hasadó három genotípus osztályhoz három, ugyanilyen arányú, jól elkülönült fenotípus osztály tartozik. A várákozásnak megfelelően az egyedek többsége, kb. 50%-a heterozigóta. Fenotípusosan ezek egyfajta köztes, vagyis átmeneti állapotú, „félrezisztens” növények (a képen külön nem jelölve). Beazonosítható az ALS génre nézve két homozigóta genotípus (25-25%), úgymint a klórszulfuronrezisztens mutáns (narancssárga háromszög), és a mutáns gént nem tartalmazó, vagyis az eredeti alapgén változatra homozigóta típus (fehér nyíl). A fehér nyíllal jelöltekben az ALS alapgén azonos az eredeti, nem rezisztens növényekével, és mindkét esetben a fenotípusos megjelenés súlyos károsodásra utal (ld. alsó cserép). A háromszöggel jelölt, magas szinten rezisztens változat külső megjelenése a nagy dózisu kezelés után is azonos a nem kezelt, nem rezisztens kontrolléval (a genotípus, vagyis az ALS génváltozat természetesen eltér). Ez a forma a herbicidrezisztencia nemesítés szempontjából

„késznek” tekinthető, mert a mutáns ALS génre nézve homozigóta, és öntermékenyítéssel tiszta vonalként fenntartható. Láthatjuk tehát, hogy heterozigóta vonalak öntermékenyítésekor kihasadnak a homozigóta rezisztens formák, melyek az elvárt magas szinten ellenállók a gyomirtószerrel szemben. Esetünkben tehát a mutáns-előállítás második lépésében már stabil rezisztens vonalat kaptunk.

Rövid kitérőként érdemes megemlíteni, hogy a szemidomináns öröklésmenet jelentősen megkönnyíti a szelekciót, mert az átmeneti forma révén megkülönböztethető a homozigóta a heterozigótától a fenotípus alapján az ismert hasadási séma szerint (4. ábra). Ezzel szemben a domináns módon öröklődő tulajdonságoknál csak kétféle fenotípus tartozik 3:1 arányban a háromféle genotípushoz, vagyis hiányzik a köztes forma. Amennyiben a klórszulfuron rezisztencia – hasonlóan néhány más növényi jelleghez – domináns módon öröklődne, úgy fenotípus alapján nem lehetne elkülöníteni egymástól a homozigóta és heterozigóta rezisztens egyedeket, mert mindkét forma magas szinten ellenálló lenne, ugyanakkor genetikai stabilitás csak az előbbtől várható (5. ábra).



4. ábra Heterozigóta szülői egyed öntermékenyítéséből származó utódnemzedék lehetséges genotípusai egyénes intermedier (esetünkben szemidomináns) öröklésmenetnél. A fenotípusok száma és megoszlási aránya azonos a genotípusokéval. A fenotípusból következtetni lehet a genotípusra.



5. ábra Heterozigóta szülői egyed öntermékenyítéséből származó utódnemzedék lehetséges genotípusai egyénes domináns öröklésmenetnél. A fenotípusok száma és megoszlási aránya (3:1) eltér a genotípusétól (1:2:1). A fenotípusból nem lehet következtetni a genotípusra.

A kezelés utáni hatodik napot követően az idő múlásával egyre markánsabban elkülönülnek az egyes rezisztencia osztályok. Ezt az alábbiakban láthatjuk.

A 6. ábrán az ALS génre nézve három eltérő Burley genotípus látható 14 nappal a klórszulfuron kezelés után, ezek: homozigóta rezisztens mutáns, heterozigóta „félrezisztens” mutáns, valamint homozigóta nem rezisztens eredeti vonal. Megfigyelhető, hogy a genotípusos különbségek markánsan megmutatkoznak a fenotípusos megjelenésben. A rezisztens növények (bal alsó cserép) legfeljebb csak nyomokban mutatnak herbicidkárosodást. A heterozigóta

állomány (jobb alsó cserép) túlélte ugyan a klórszulfuron kezelést, de ezzel a rezisztencia szinttel alkalmatlan volna szántóföldi kezelésre. A nem rezisztens növények, amelyek az ALS alapgént hordozzák, nem éltek túl a kezelést (felső cserép). Megállapítható, hogy 14 nappal a kezelés után a gyakorlati szelekció számára megbízhatóan felismerhetők a különböző rezisztencia osztályok.



6. ábra Különböző Burley genotípusok fenotípusos válasza a klórszulfuron kezelésre

Vetés: 2004.03.23.

Kezelés: 2004.04.05.

Felvétel: 2004.04.19.

A 7. ábra heterozigóta szülőtől származó Burley állomány hasadását mutatja 12 nappal a gyomirtószeres kezelés után. A heterozigóta szülő a mutáns előállítás első lépésének terméke. Az 3. ábrához hasonlóan itt is megfigyelhető az elméletileg várt 1:2:1 arányú hasadás az ALS génre, és jól elkülöníthetők az egyes rezisztencia osztályok (néhány mutáns homozigóta megjelölve). A homozigóta egyedeket fölnevelve és öntermékenyítve ebben a vonalban is már a második lépésben stabilizáltuk a klórszulfuron rezisztenciát.



7. ábra Az ALS génre heterozigóta Burley egyed öntermékenyítéséből származó nemzedék hasadási aránya a klórszulfuron rezisztenciára 1:2:1

Vetés: 2003.12.11.
Kezelés: 2003.12.22.
Felvétel: 2004.01.03.

Back-cross program a génátvitelre

Az SZBK-val folytatott együttműködésben létrehoztuk egy-egy Virgínia és Burley vonal mutáns változatát. Az egyéb, már létező, ismert dohányvonalak- és fajták herbicidrezisztenssé alakításához e két heterozigóta, „félrezisztens” vonal adta a kiindulási alapot, vagyis a mutáns gént. Mint fentebb láttuk, e vonalak közvetlen szántóföldi termesztésre nem alkalmasak, de minthogy hordozzák a mutáns ALS gént, felhasználhatók a génátvitelhez (természetesen hagyományos, ivaros keresztezéssel, nem géntechnológiával). A feladat az, hogy a már létező fajtákban „kicseréljük” az ALS gén alapváltozatának mindkét kópiáját a mutáns változatra. Ennek során a mutáns gént hordozó vonalat keresztezzük, majd több lépésben visszakeresztezzük az átalakítandó vonallal, miközben minden egyes nemzedékben szelekciót végzünk a heterozigóta félrezisztensekre. A kellő számú visszakeresztezés után öntermékenyítéssel megkapjuk az átalakítani kívánt dohányvonal homozigóta gyomirtószer ellenálló változatát.

A 8. ábra az ALS gén hasadását mutatja, amikor a nem rezisztens, vagyis az alap ALS génre homozigóta formát kereszteztük a heterozigóta mutánssal.



8. ábra A nem rezisztens alapgénre homozigóta Virginia vonal és az ALS génre heterozigóta mutáns vonal keresztezéséből származó utódnemzedék hasadási aránya a klórszulfuron rezisztenciára 1:1

Vetés: 2004.01.23.

Kezelés: 2004.02.05.

Felvétel: 2004.02.22.

A kezelés utáni 17. napon élesen elkülönül az alapgénre homozigóta herbicidérzékeny forma, és a mindkét (alap és mutáns) génváltozatot hordozó heterozigóta, köztes forma. A megfigyelt hasadás megközelíti az elméletileg várható 50-50%-os arányt (9. ábra).

x	Hímivar-sejt ♂ (pollen)	
	A	a
Nőivar-sejt ♀ (petesejt)	a	Aa
	a	Aa

Az utódnemzedékben a genotípusok aránya 1:1

A: az ALS gén mutáns változata
a: az ALS gén alapváltozata

A genotípusok fenotípusos megnyilvánulása: **Aa**-félrezisztens, **aa**-nem rezisztens

9. ábra A mutáns ALS génre heterozigóta apai egyed és az alapgénre homozigóta anyai vonal keresztezéséből származó utódnemzedék lehetséges genotípusai. Egygénés intermedier (esetünkben szemidomináns) öröklésmenetnél a fenotípusok száma és megoszlási aránya azonos a genotípuséval. A fenotípusból következtetni lehet a genotípusra.

Minthogy a kezeléstől számított 6-12-ik napon már különválaszthatók a különböző rezisztencia szintű egyedek, a módszer kiválóan alkalmas a klímaszobában folytatott, gyorsított visszakereszteléses (back-cross) programhoz. A későbbi fajtafenntartás már szabadföldön történhet.

Egy adott vonal már létező hímsteril változatának herbicidrezisztenssé alakításához két keresztezés szükséges a mutáns gént hordozó, vele azonos fajtájú fertilis vonallal.

A 2002-től 2005-ig tartó back-cross programban előállítottuk:

- a Pallagi 5 Burley F₁ hibrid mindkét szülői vonalának homozigóta herbicidrezisztens változatát,
- ugyanezen F₁ hibrid MS (hímsteril) rezisztens változatát,
- a Hevesi 9 Virgínia F₁ hibrid mindkét szülői vonalának homozigóta herbicidrezisztens változatát, ezen belül az egyik szülői vonalat csak kb. 90%-os készütséggel,
- és folyamatban volt egyéb Virgínia vonalak rezisztenssé alakítása különböző készütségi szinten.

Az új szelekciós módszer gyors előrehaladást tett lehetővé a dohányynemesítésben. A 2002-2005. között klímaszobában végzett, fent összefoglalt munka szántóföldön legkevesebb 8-10 évet vett volna igénybe. Hangsúlyozni kell azonban, hogy szántóföldön nem végezhető a herbicidrezisztenciára történő szelekciós nemesítés. Ennek legfőbb oka, hogy a szántóföldi kiscellás környezet nem kellően „finomra hangolt” a különböző rezisztenciájú formák megbízható felismeréséhez. A rutin eljárásá fejlesztett csíranövény-módszer megbízhatósága ezzel szemben 100%-os.

A keresztrezisztencia feltárása

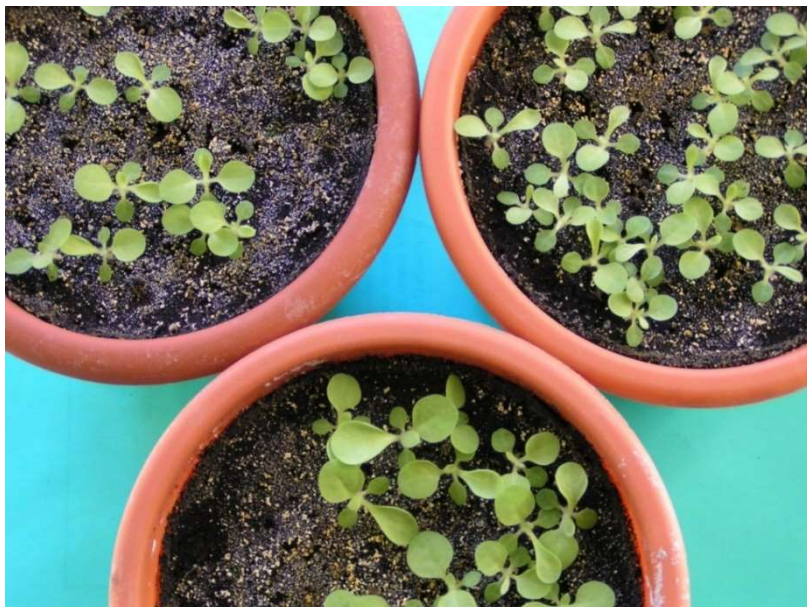
Annak érdekében, hogy a rezisztenssé tett vonalaink és fajtáink a klórszulfuron európai uniós engedélyének visszavonása után, 2005-öt követően is felhasználhatók maradjanak, keresztrezisztenciát kerestünk egyéb, korszerűbb szulfonilkarbamid hatóanyagokkal, melyek nem esnek a visszavonás hatálya alá. E munkáról korábbi közleményemben bővebben írtam (2). A szkríneléshez tetszőlegesen – messze nem teljes körűen – kiválasztott herbicidek között két gyors találatunk volt.

A 10. ábra az amidoszulfuron kezelésre adott növényi választ mutatja 10 nappal a kezelés után.

Bal felső: klórszulfuron standard szelekciós dózis

Alsó: amidoszulfuron, a klórszulfuronnal megegyező dózis (hatóanyagra számítva)

Jobb felső: amidoszulfuron, a klórszulfuron dózisának a kétszerese



10. ábra A klórszulfuron rezisztens hímsteril Burley dohányvonal keresztrezisztenciát mutat az amidoszulfuron herbiciddel szemben 10 nappal a kezelés után

Vetés: 2005.03.09.
Kezelés: 2005.03.21.
Felvétel: 2005.03.31.

A növényi válaszból egyértelműen megállapítható a keresztrezisztencia az új herbiciddel szemben, s ennek mértéke közel áll a klórszulfuronnal szembeni rezisztenciához.

A 15 nappal később, vagyis 25 nappal a kezelés után készített felvétel megerősíti a fenti megállapítást (11. ábra).



11. ábra A klórszulfuron rezisztens Burley dohányvonal keresztrezisztenciát mutat az amidoszulfuron herbiciddel szemben 25 nappal a kezelés után

Vetés: 2005.03.09.
Kezelés: 2005.03.21.
Felvétel: 2005.04.15.

A trifluszulfuron-metil herbiciddel szemben a keresztrezisztenciát a 12. ábra mutatja nyolc nappal a kezelés után, rezisztens Virgínia dohányon. A bal felső kezeletlenhez képest a klórszulfuron standard dózissal kezelt alsó cserép növényei elszórtan enyhe, múló tüneteket mutatnak, amennyiben néhány levél kismértékben „kanalasodik”. A keresztrezisztenciát jól mutatja a jobb felső cserép, ahol a klórszulfuron dózisához képest 1,6-szeres mennyiségben alkalmazott trifluszulfuron-metil hatóanyag nem váltott ki szemmel látható károsodást.



12. ábra A klórszulfuron rezisztens Virgínia dohányvonal keresztrezisztenciát mutat a trifluszulfuron-metil herbiciddel szemben 8 nappal a kezelés után

Vetés: 2005.05.05.

Kezelés: 2005.05.17.

Felvétel: 2005.05.25.

Elrendezés a 12. és a 13. ábrán

Bal felső: kezeletlen

Alsó: klórszulfuron standard szelektív dózis

Jobb felső: trifluszulfuron-metil a klórszulfuron dózisának 1,6-szerese

Ugyanezt a kezelést elvégezve az ALS alapgént tartalmazó „herbicidérzékeny” formával látható, hogy mindkét gyomirtószer súlyosan károsította a növényeket a kezeletlen kontrolhoz képest (13. ábra).



13. ábra A klórszulfuron és a trifluszulfuron-metil gyomirtószer kártétele herbicidérzékeny dohányfajtán

Vetés: 2005.05.05.

Kezelés: 2005.05.17.

Felvétel: 2005.05.25.

Mindkét hatóanyag, mellyel keresztrezisztenciát sikerült kimutatni 2005-ben, még e sorok írásakor, 2020-ban is felhasználási engedéllyel rendelkezett Magyarországon.

A keresztrezisztencia feltárása utáni lépés annak megállapítása, hogy a két fenti herbicid a klórszulfuron-rezisztens gazdanövényen alkalmazva felhasználható-e a szádor elleni szántóföldi védekezésben. Bár erre jó az esély, ennek igazolására már nem kerülhetett sor, mert a kutatás a kutatóintézeti cégátalakulással összefüggésben 2005. őszén megszakadt.

Összefoglalás, következtetések

A klórszulfuron-rezisztenciára történő szelekcióhoz általunk alkalmazott csíranövény-módszer legfőbb ismérve, hogy egyszerű, gyors, megbízható és költséghatékony.

A nagyfokú precizitáshoz társuló hatékonyság gyors előrehaladást tett lehetővé a fajtaelőállításban a tévedés kizárása mellett. A gyorsaság különösen nagy érték a növénynemesítés köztudottan időigényes folyamatában.

Csíranövény-módszerünkkel mellőzhettük a hagyományos, költséges és hosszadalmas szabadföldi szelekciót. Így vált lehetővé, hogy a partnerintézménytől 2002-ben kapott egyik nyers (heterozigóta) burley vonalból kiindulva 2004-ben már szántóföldi kiscellán és félüzemi kísérletben bizonyíthatott a Pallagi 5 F1 hibrid hímsteril klórszulfuron rezisztens változata a szádor elleni védekezésben.

Utószó

A világon a herbicidrezisztens kultúrnövény fajták túlnyomó részét géntechnológiai módszerekkel hozzák létre. E növényfajták társadalmi megítélése ellentmondásos. Az általunk előállított rezisztens vonalak nem „génmódosítottak”, ezért piaci potenciáljuk jelentős volt az előállításuk idején.

Az általunk létrehozott mutáns ALS gén a klórszulfuron európai uniós engedélyének visszavonása után is felhasználható lett volna az unión kívüli dohányvetőmag piacokon, ahová a visszavonás hatálya nem terjedt ki. A felhasználás történhetett volna akár a magyarországi fajták termesztése révén, akár a helyi dohányfajták igény szerinti rezisztenssé alakításával. A dohányfojtó szádor jelentős területeken károsít világszerte, és nagy az igény a hatékony védekezési eljárásra.

A cikkben bemutatott keresztrezisztencia a rezisztenssé tett fajtáink tovább élését biztosíthatta volna az Európai Unióban, ezen belül Magyarországon.

A Debreceni Dohánykutató Intézetben folytatott herbicidrezisztencia nemesítés, mint kutatási téma 2005. után, a cégátalakulással derékba tört. Bár a génanyag továbbra is rendelkezésre állt, a munka folytatásáról nincs hír. A témában addig elért eredményeket nem hasznosították. Más K+F témákkal együtt (3, 4) ez a munka is a nagy ráfordítással létrehozott, majd elvesztegetett

eredmények tárházát gazdagítja az egykor volt dohánykutató RT-ben, illetve kivásárolt vagyonrészében.

Hivatkozások

1/ Gondola I.: Védekezés a dohányfojtó szádor (*Orobanche ramosa* L.) ellen herbicidrezisztens gazdanövény használatával. Növényvédelem 42 (10), 537-543, 2006

2/ Gondola I. (2012)

Egy látogatás margójára – avagy, a dohány élősködője továbbra is károsít

<http://madosz.hu/archive/article-view?id=354>

A kutatások összefoglalása 2000-2004

<http://madosz.hu/storage/kcf-upload/files/regi-fajlok/File/drgondola/A%20kutatasok%20osszefoglalasa%202000-2004.pdf>

3/ Gondola I. (2013)

Epizód a magyar dohánynemesítés történetéből

<http://madosz.hu/storage/kcf-upload/files/regi-fajlok/File/drgondola/Epizod.pdf>

4/ Gondola I. (2014)

A dohány rezisztencianemesítése: a paradicsom bronzfoltosság vírus esete

http://madosz.hu/storage/kcf-upload/files/regi-fajlok/File/drgondola/Dr_Gondola%20TSWV.pdf