

Zárójelentés OTKA 75381

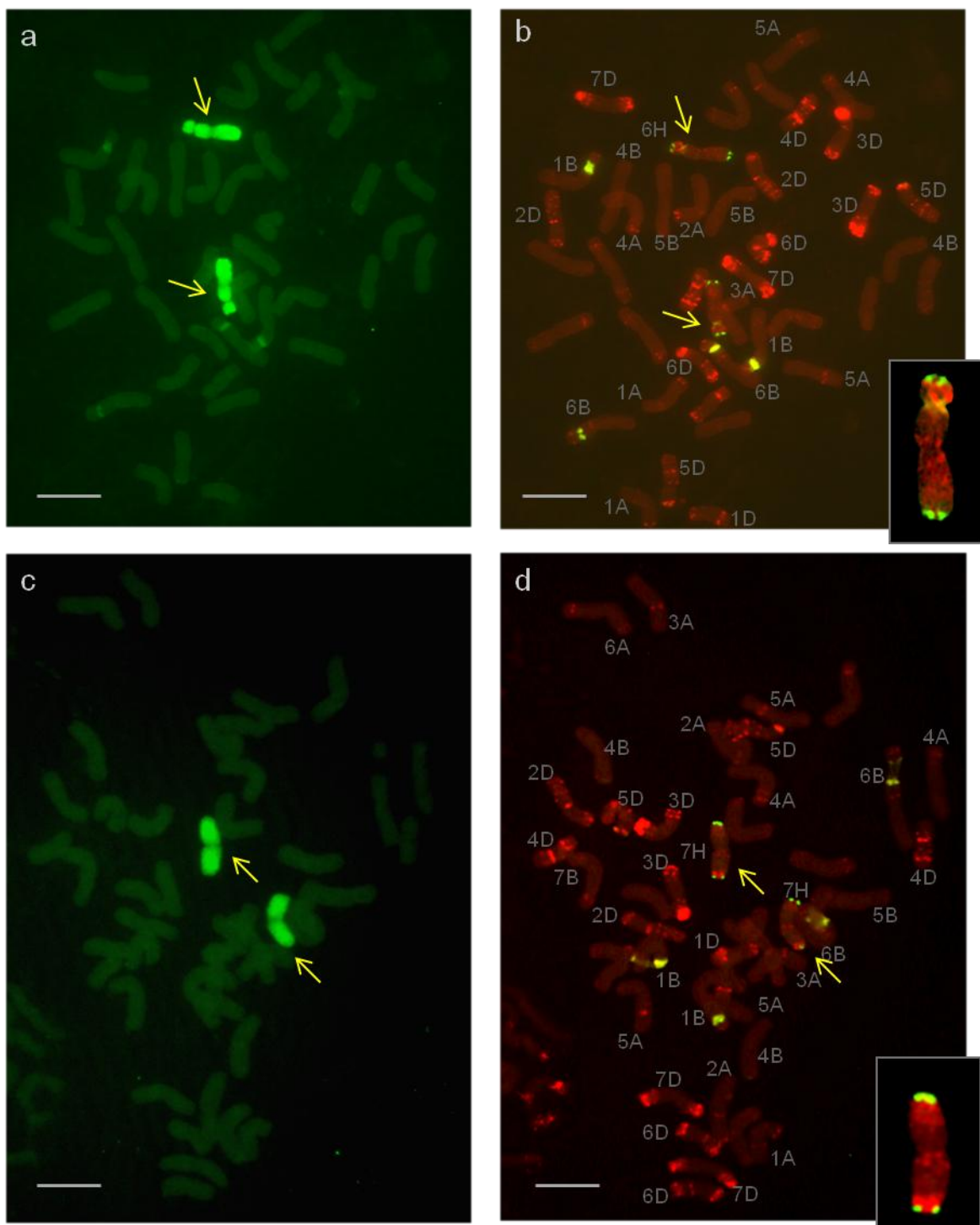
A búza genomba beépült árpa kromoszóma-régiók hatásának vizsgálata a koraiságra, a minőségre és a szárazságtűrésre

A pályázatban célul tűztük ki a búza genomba beépített árpa kromoszómák hatásának vizsgálatát a koraiságra, a minőségi paraméterekre és a szárazságtűrésre. A vizsgálatokban a Martonvásáron előállított búza/árpa addíciós és transzlokációs vonalakat használtuk fel. A korábban előállított vonalak mellett folyamatosan válogattunk ki és szaporítottunk új búza/árpa introgressziós vonalakat molekuláris citogenetikai módszerek (FISH, GISH) és molekuláris markerek segítségével.

1. Új búza/árpa addíciós vonalak előállítása

A pályázati munka során az Mv9 kr1 (martonvásári őszi búzatörzs) × Igr1 (német 2-soros őszi árpa) és az Asakaze komugi (japán fakultatív búzafajta) × Manasz (ukrán 6-soros őszi árpa) kombinációból állítottunk elő diszómás addíciós vonalakat. Egyes vonalakat már a pályázat beadása előtt létrehoztunk, de több vonalból addig csak egy-egy növényt válogattunk ki (Mv9 kr1/Igr1 7H), vagy csak monoszómás addíciók álltak rendelkezésre (2H 3H, Asakaze /Manasz).

Az Mv9 kr1/Igr1 kombinációból 2H, 3H, 4H, 6HS, 7H és 1HS izokromoszómás diszómás addíciós vonalakat állítottunk elő. Az árpa kromoszómákat búza háttérben genom *in situ* hibridizációval (GISH) mutattuk ki, fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) azonosítottuk, és azt molekuláris markerekkel megerősítettük. Vizsgáltuk az egyes vonalak genetikai stabilitását. A vonalakat felszaporítottuk és morfológiai tulajdonságaikat jellemeztük (Szakács-Molnár-Láng, 2010, Genome 53(1): 35-44.) A létrehozott vonalak lehetővé tették, hogy az Igr1 árpa 1HS, 2H, 3H, 4H, 6HS, és 7H kromoszómájának hatását tanulmányozzuk búza háttérben. Az Mv9 kr1/Igr1 kombinációból létrehozott 7D-5HS transzlokációs vonalban az Igr1 5H árpa kromoszóma rövid karjának egy szakasza épült be, ami lehetővé teszi ennek a kromoszómának a vizsgálatát is.



1.ábra. A 6H és a 7H Asakaze komugi/Manasz addíciós vonalak szomatikus kromoszómái fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) után. a, c, Az árpa kromoszómák kimutatása genomi *in situ* hibridizációval (GISH), az árpa kromoszómák zölden fluoreszkálnak (nyíllal jelölve). b, d, A kromoszómák azonosítása FISH-sel az Afa family (piros), HvT01 (zöld) és pTa71 (narancs) DNS próbákkal.

Az Asakaze × Manasz kombinációból a 2H, 3H, 4H, 6H és 7H diszómás addíciós vonalakat állítottuk elő, amelyeket FISH-sel repetitív DNS próbák segítségével azonosítottunk (1. ábra), és azt molekuláris markerekkel alátámasztottuk. A vonalakat elszaporítottuk és fenotípusos tulajdonságaikat fitotronban és szántóföldi körülmények között is jellemeztük (Molnár-Láng et al. 2012. *Genome* 55(4): 302-311). Az Igri (német kétsoros őszi árpa) és a Manasz (ukrán hatsoros őszi árpa) árpa kromoszómákat hordozó vonalakat (2. ábra) szántóföldön elszaporítottuk, ami lehetővé tette, hogy a különböző agronómiai vizsgálatokat elvégezhessük, azokhoz a szükséges mennyiségű szemet biztosítsuk.



2. ábra Az Asakaze komugi/Manasz addíciós vonalak (2H, 3H, 4H, 6H, 7H) kalásza a szülőpartnerek (Asakaze komugi – japán fakultatív búzafata, Manasz – ukrán hatsoros árpafajta) mellett. Az első visszakereszteztést a Chinese Spring kínai tavaszi búzafajtaival végeztük, ezért ennek a genotípusnak a kalászáat is feltüntettük utolsóként a képen.

2. Koraiság

Vizsgáltuk a búza genomba beépített árpa kromoszómák hatását a koraiságra, a kalászolási és virágzási időre fitotronban mesterséges körülmények közt és szántóföldön két egymást követő évben. Fitotronban három kezelést alkalmaztunk, rövid napos megvilágítást (12 óra), hosszú napos megvilágítást (16 óra) és vernalizáció nélkül neveltük a növényeket kezdetben 15/10 °C-on, majd bokrosodás után 2 °C-kal emeltük a hőmérsékletet. A 2H, 3H, 4H, 6HS, 7H Mv9 kr1/Igri és a 2H, 3H, 4H, 6H és 7H Asakaze/Manasz diszómás addíciós vonalakból 5-5 növényt neveltünk fitotronban mindegyik kezelésben. Szántóföldön genotípusonként 10-10 növényt felvételeztünk.

Mindegyik kezelésben szántóföldön és fitotronban is, mindkét fajtakombinációban a 7H kromoszómát hordozó vonalak voltak a legkorábbiak. Fitotronban mindkét fajtakombinációban minden kezelésben a 4H kromoszómát hordozó vonalak voltak a legkésőbbiek, szántóföldön azonban az Asakaze/Manasz kombinációban a 6H kromoszómát hordozó vonalak virágoztak legkésőbb. Az Asakaze/Manasz kombinációban a 7H és a 4H addíciós vonalak virágzásában szántóföldön 6 nap volt a különbség, ez fitotronban hosszú napos megvilágítás mellett 16 napra, rövid napos megvilágítás mellett 44 napra növekedett. Az Mv9 kr1/Igri kombinációban a 7H addíciós vonal 7 nappal korábban virágzott, mint a 4H addíció. Rövid napos megvilágítás mellett a 4H és a 7H virágzási idejének különbsége 52 napra növekedett. A többi vonal virágzása fitotronban a két vonal közé esett. Sajnos az 1H és az 5H kromoszómák hatását nem tudtuk vizsgálni. Az 1H kromoszóma sterilitást okoz, az 1HS izokromoszómát hordozó addíciós vonal pedig rendkívül instabil. Az 5H kromoszóma mindkét kombinációban BC₂ nemzedékben eliminálódott.

A fenotípusos tulajdonságok részletes feldolgozásakor megfigyeltük, hogy az árpa jó bokrosodóképessége elsősorban a 7H addíciós vonalakban nyilvánult meg, ezek szignifikánsan jobban bokrosodtak mint a búza, mindkét fajtakombinációban. A legnagyobb fertilitást a 4H addíciós vonalakon tapasztaltuk. A 4H Asakaze/Manasz addíciós vonal kalászhosszai szignifikánsan hosszabbak voltak mint a búza szülő. A kísérletből Farkas András, Molnár István, Karsai Ildikó és Lángné Molnár Márta társ szerzőségével „The effect of winter barley chromosomes added into wheat/barley addition lines on flowering time under short and long day length in phytotron and in the field” címmel publikációt készítettünk, amelyet az Euphytica-ban kívánunk publikálni.

3. Minőség

Vizsgáltuk a búza/árpa addíciós és introgressziós vonalak minőségi paramétereit. Miután a sütőipari vizsgálatok nagy mennyiségű szemet igényelnek, először azokat a genotípusokat vizsgáltuk, melyekből a kb 1 kg szemtermés már rendelkezésre állt. Vizsgáltuk a fehérjetartalmat, a sikértartalmat, a sikerterületet, a Zeleny indexet, az esésszámot, a gluteninindexet. Megállapítottuk, hogy a búza/árpa transzlokációs vonalak közül a 6B-4H Mv9kr1/Betzes transzlokációs vonal kiemelkedő fehérjetartalommal és sikértartalommal rendelkezik, ellenben glutenin indexe kedvezőtlenül alacsony.

Az Mv9 kr1/Igri addíciós vonalakat összehasonlítva megállapítottuk, hogy a 3H Mv9 kr1/Igri addíciós vonal több évben több ismétlésben is magasabb fehérjetartalommal rendelkezett, mint a kontroll búzaszülő (Mv9kr1) és a 2H addíciós vonal (1. év Mv9 kr1- 15.78%, 3H -18.25%; 2H – 15.61%; 2. év Mv9 kr1- 12.45%, 3H -14.5%, 2H – 12.87%). A különbség a két vonal közt és az Mv9 kr1-hez viszonyítva is szignifikáns volt. A 4H addíciós vonal fehérjetartalma a 2H és a 3H közé esett. Hasonlóképpen magasabb volt a 3H Mv9 kr1/Igri addíciós vonal sikértartalma. Érdekes megfigyelés, hogy a 2H, 3H búza/árpa addíciós vonalak esésszáma a búza szülőpartnernél szignifikánsan magasabb lett, amely a kalászban csírázás gátlása miatt fontos.

Vizsgáltuk a búza/árpa introgressziós vonalak β -glukántartalmát is. A β -glukán az árpa endospermium sejt falában fordul elő és a legtöbb gabonafélében megtalálható. Az egészséges táplálkozás szempontjából fontos rost, és kedvező élettani hatása van a koleszterin tartalom csökkentésére. Az árpában lényegesen nagyobb mennyiségben fordul elő, mint a búzában. Kísérleteinkben vizsgáltuk az Asakaze komugi/Manasz kombinációban a 7H addíciós vonal β -glukántartalmát a búza és az árpa szülőpartnerekhez viszonyítva. A Chinese Spring és az Asakaze komugi búzafajtákban a β -glukántartalom 9.65 mg (mg/g szárazanyag) és 12.10 mg volt, ellenben az árpafajtában négyszeres mennyiséget mutattunk ki (Manasz – 44.82 mg, Betzes – 45.8 mg). A 7H addíciós vonalban és a 4BS.7HL transzlokációs vonalban a β -glukántartalom a búza szülőhöz képest kétszeresére növekedett (23.2 mg és 20.41 mg) (Cseh, A., Kruppa K., Molnár I, Rakszegi M, Dolezel ,J., Molnár-Láng, M. 2011. Genome 54:(10) 795-804.)

4. Szárazságtűrés

A búza/árpa introgressziós vonalak és a szülői genotípusok abiotikus stressztoleranciáját (ozmotikus stressz) laboratóriumi körülmények között vizsgáltuk. A növényeket módosított Hoagland tápoldatban neveltük négy hetes korukig $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson normál légköri CO_2 koncentráció mellett. Az ozmotikus és sókezelések adott koncentrációjú polietilén-glikol és sóoldatokkal történtek. A növények vízállapotának változását a relatív víztartalom (RWC) meghatározásával követtük nyomon. Az intakt levelek gázcsere paramétereit infravörös gázanalízissel határoztuk meg (GFS-300-FL, H. Walz, Effeltrich, Németország) gázanalizátort használva. A gázcsere és a klorofill a fluoreszcencia indukciós mérések egy időben, ugyanazokon a leveleken történtek. Az asszimilációs ráta (A), a sztómakonduktancia (gs) és a quenching paraméterek számítása a pályázatban megadottak szerint történt. Az ozmotikus és sókezelések adott koncentrációjú polietilén-glikol és sóoldatokkal történtek. A vizsgálatok célja volt, hogy meghatározzuk, hogy a fiatal növénykorban mérhető paraméterek alapján, a beépített árpa kromoszómák milyen mértékben befolyásolják a búza abiotikus stressztoleranciáját. A kísérletben laboratóriumi körülmények között megvizsgáltuk, hogy a PEG indukálta ozmotikus stressz után milyen mértékben állapítható meg különbség az egyes vonalak abiotikus stressztoleranciájában.

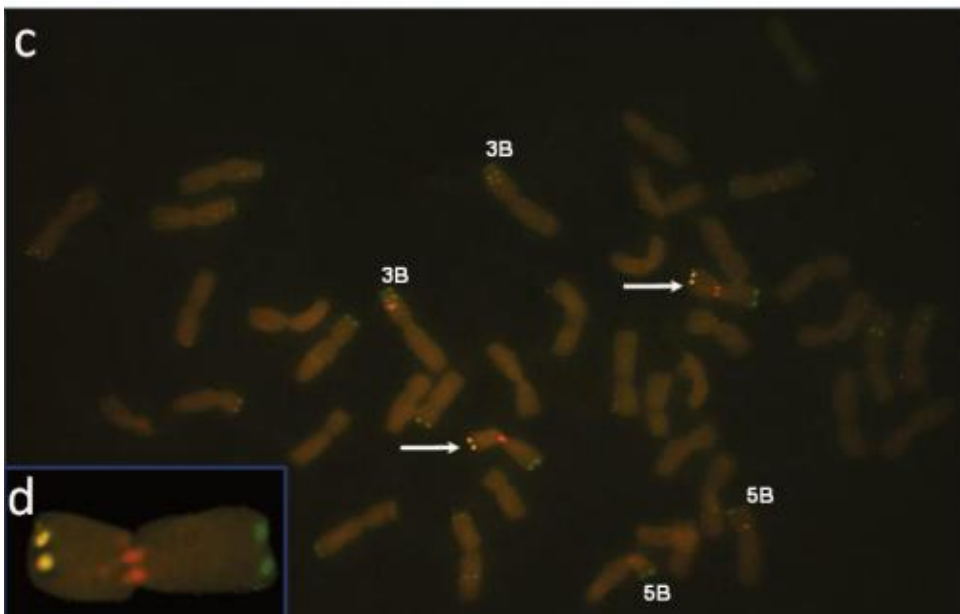
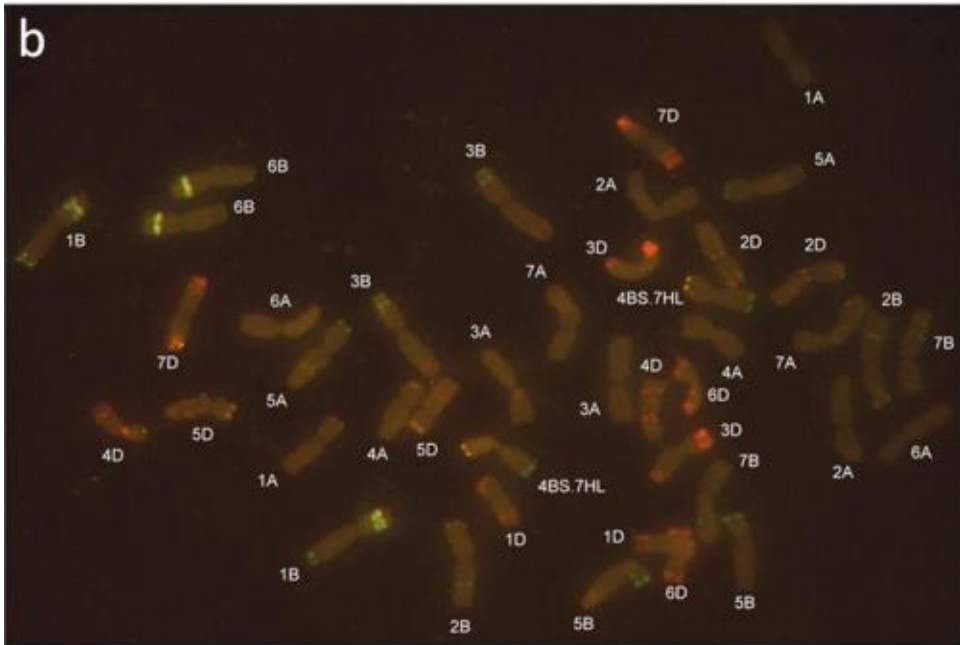
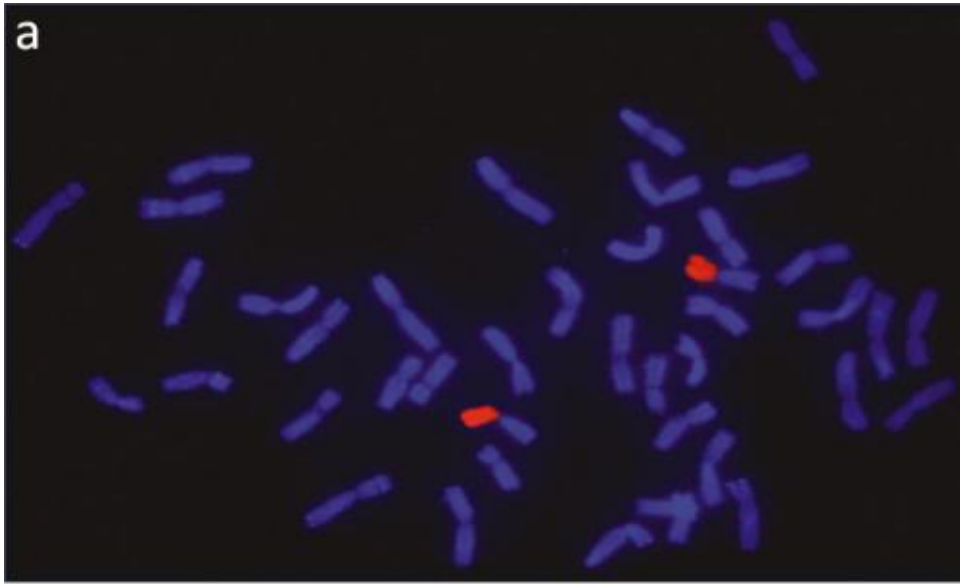
Az ozmotikus kezelés az árpa szülői vonalakban (Igri, Betzes, Manasz) erős sztómazárást és asszimilációs ráta (A) csökkenést okozott, ami legkifejezettebben az Igri árpafajtánál jelentkezett. Ezzel szemben a búzavonalak (Chinese Spring, Asakaze komugi, Martonvásári 9 kr1) sztómái a közepes és erős ozmotikus kezelés hatására nagyobb nyitottságot mutattak. A vízhiány a búza/árpa introgressziós vonalakban a szülői árpafajták viselkedésének megfelelő, jelentős sztómazárással járt együtt. Ennek megfelelően az asszimilációs ráta sem haladta meg a szülői búzafajták megfelelő értékeit.

Irodalmi adatok szerint a szárazságtűrésért és a vízhasznosítási hatékonyságért (WUE) felelős genetikai régiók a 6H (hosszú kar) és a 7H (centromera körüli régióban) kromoszómákon található (Cattivelli et al. 2002, Molnár et al. 2007). A WUE-t levél szinten mint a nettó CO_2 asszimilációs ráta (A) és a sztómakonduktancia (gs) hányadosaként határozhatjuk meg (WUEI, Martin and Ruiz-Torres, 1992). Az ozmotikus kezelések megkezdése előtt a WUEI paraméter nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált szülői vonalak között. A szülői vonalak közül mérsékelt ozmotikus kezelésre a WUEI nem csökkent a búza genotípusokban és Igri árpafajtában, sőt a Chinese Spring (CS) búzafajtában mérsékelten emelkedett.

Ugyanakkor Betzes árpafajta vízhasznosítási hatékonysága szignifikánsan csökkent ($P \leq 0.01$). Ennek ellenére a 4H(4D) CS/Betzes szubsztitúciós és a 3HS.3BL Mv9kr1/Betzes centrikus fúziót hódzó vonalban a WUEI értékei megfelelő szinten maradtak, sőt a 6H Mv9kr1/Betzes diszómás addíciós vonalban kimagasló emelkedés volt kimutatható ($P \leq 0.01$). A WUEI ilyen emelkedése irodalmi adatok szerint a szárazságra toleráns növényekre jellemző (Medrano et al. 2002).

A vizsgált szülői árpa genotípusok ozmotikus stresszre mutatott toleranciája nem haladja meg a búzafajtákét. Ennek ellenére néhány introgressziós vonal (3H Mv9kr1/Igri addíció, 4H Asakaze/Manasz addíció, 7DL.7DS-5HS Mv9kr1/Igri transzlokáció, 6BL.6BS-4H CS/Betzes transzlokáció és a 6H Mv9kr1/Betzes addíció) a szülői árpafajtákhoz képest kevésbé érzékeny a vízhiányra. Kiemelkedő vízhasznosítási hatékonysággal rendelkezik a 6H Mv9kr1/Betzes-addíciós vonal.

Az ozmotikus stresszre mutatott tolerancia mellett a szülői árpa és búzavonalak genotípusok és búza/árpa introgressziós vonalak sótűrését is vizsgáltuk. A sóstressz nem csak ionikus, hanem ozmotikus hatással is rendelkezik, ezért a vizsgált vonalak relatív víztartalma a kezelések hatására a legtöbb vonal kivételével csökkent. Ezzel párhuzamosan a szülői és az introgressziós vonalak sztómakonduktanciája is általában csökkent, holott a a víztartalom csökkenése ezt nem indokolta minden esetben. A Manasz árpafajta, a 7H Asakaze/Manasz és a 6H Mv9kr1/Betzes addíciós vonalak esetében a sztómakonduktancia a sóstressz alatt is kielégítő maradt. Ez utóbbi vonalakban a nettó fotoszintetikus szén-dioxid fixálás még a közepesen erős, 200 mmol/L-es NaCl koncentráció mellett is megfelelően magas mértékben ment végbe, valamint azt sztomatikus faktorok limitálták. Mindez manifesztálódott a növények szárazanyag-termelésében is. Ezek az eredmények összhangban állnak azokkal az irodalmi adatokkal (Colmer et al. 2005), amelyek a 7H kromoszóma szerepét hangsúlyozzák a levelek nátrium és kálium tartalmának módosításában, és magyarázzák a 7H Asakaze/Manasz addíciós vonal erőteljes sótoleranciáját. Érdekes 6H Mv9kr1/Betzes addíciós vonal megfelelő sótűrése is, habár toleranciáját a szülői genotípusok viselkedése nem magyarázza (Dulai, S. Molnár, I., Haló, B., Molnár-Láng, M. 2010. Photosynthesis in the 7H Asakaze komugi/Manas wheat/barley addition line during salt stress. *Acta Agronomica*, 58(4): 367-376.)



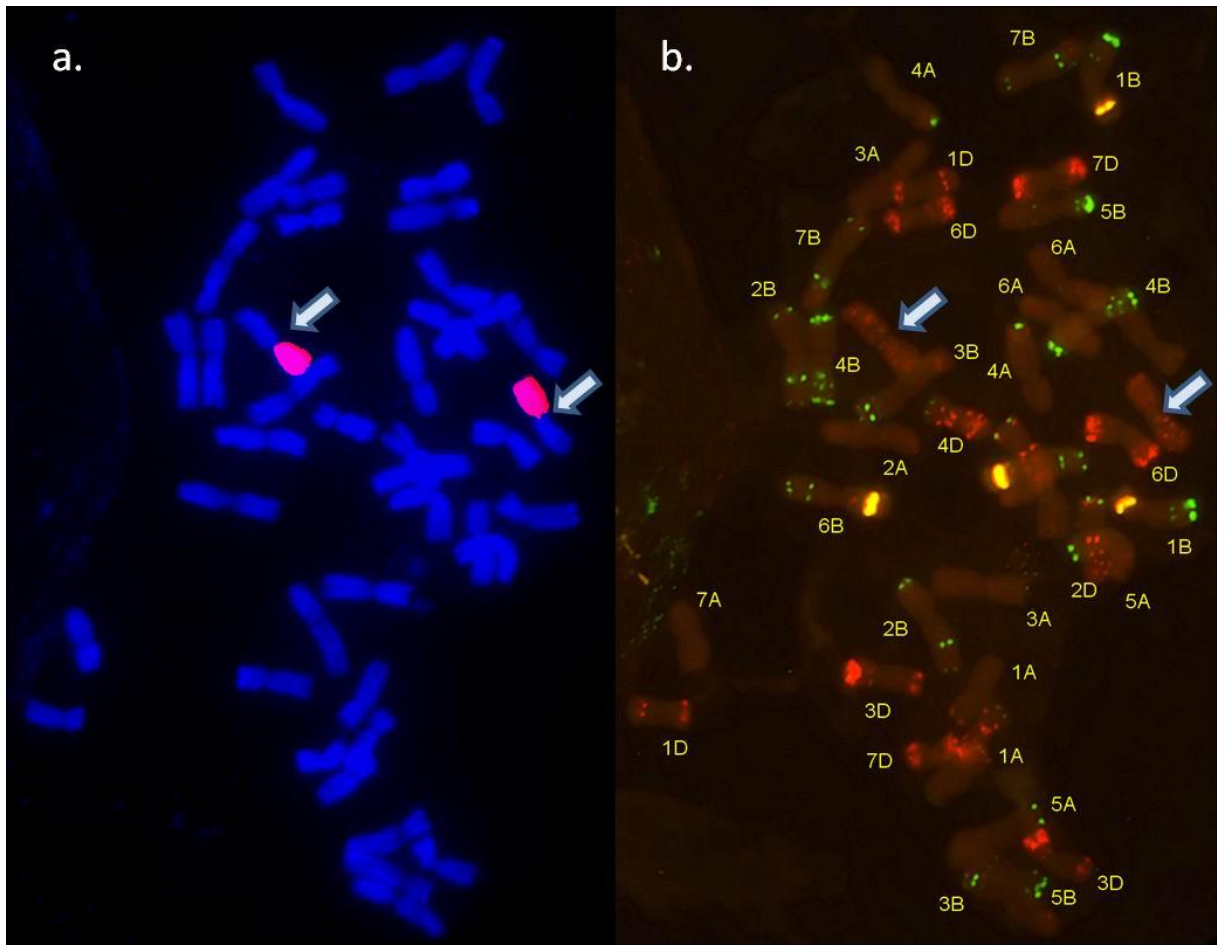
3. ábra

Az Asakaze komugi \times Manasz hibridből származó 4BS.7HL centrikus fúzió szomatikus kromoszómái *in situ* hibridizáció után. a, Árpa kromoszómakar kimutatása GISH-el (árpa kromoszómakar vörös, búza kromoszómák kékek). b, A kromoszómák azonosítása Afa family (vörös), pSc119.2 (zöld) és pTa71 (sárga) próbákkal. c, A kromoszómák azonosítása FISH-sel pSc119.2 (zöld), árpa szubteloméra specifikus próba HvT01 (sárga), centroméra specifikus próba (AGGGAG)_n vörös.

5. Búza/árpa transzlokációk előállítása

Az Asakaze komugi/Manasz kombinációban genomi *in situ* hibridizációval (GISH) kimutattunk egy spontán transzlokációt, amelyet FISH-sel és molekuláris markerekkel 4BS.7HL centrikus fúzióknak azonosítottunk (3. ábra). A transzlokációs vonal segítségével a 7H kromoszóma hosszú karján térképeztük a *HvCslF6* gént, amely a β -glukán szintézisért felelős. A *HvCslF6* génről eddig csak azt publikálták, hogy a 7H kromoszóma centroméra körüli régiójában helyezkedik el, de nem volt ismert melyik kromoszómakaron. A transzlokáció és 7HL diteloszómás vonalak segítségével sikerült pontosan térképezni ezt a gént (Cseh et al. 2011. Genome 54:(10) 795-804.). A transzlokációs vonal β -glukán tartalma a búza szülőnek kétszerese lett, amely érték búza genotípusokban nem fordul elő, ezt csak az árpa lényegesen magasabb β -glukántartamának átvitelével lehetett elérni. A β -glukán az egészséges táplálkozás szempontjából fontos paraméter.

Homeológ transzlokációk létrehozásának céljával az Asakaze komugi/Manasz addíciós vonalakat kereszteztük a 2C búza/*Aegilops cylindrica* addíciós vonallal, mert a 2C kromoszóma gametocid géneket hordoz és kromoszóma átrendeződéseket hoz létre az utódokban. A gametocid rendszer segítségével hozták létre búzában a deléciós sorozatot, illetve állítottak elő transzlokációkat a Chinese Spring/Betzes addíciós vonalból Endo és munkatársai. Kísérleteinkben az Asakaze komugi/Manasz addíció \times 2C CS/Ae. *cylindrica* keresztezésből származó F₁ szemeket 2011-ben tenyésztben elvetettük, a növényeket izoláltuk. Az izolált szemekben megkezdtük GISH-sel az átrendeződések kimutatását. A 4H Asakaze/Manasz \times 2C Ae. *cylindrica* keresztezésből származó F₂ szemekben eddig 50 vizsgált szemből 6-ban találtunk búza/árpa transzlokációs kromoszómákat. A továbbiakban vizsgálni kívánjuk a 7H Asakaze /Manasz \times 2C hibridek utódait is.



4. ábra

A 4HL.5DL búza/árpa centrikus fúziót hordozó vonal szomatikus kromoszómái *in situ* hibridizáció után. a, Az árpa kromoszómakar kimutatása GISH-sel (árpa kromoszómakar vörös, búza kromoszómák kékek). b, Kromoszómák azonosítása fluoreszcens *in situ* hibridizációval Afa family (vörös), pSc119.2 (zöld) és pTa71 (sárga) DNS próbákkal.

A 4H(4D) Mv9kr1/Betzes szubsztitúciós vonalat a CS *ph* mutánsal keresztezve egy 4HL.5DL transzlokációs vonalat állítottunk elő, amelyet FISH-sel és molekuláris markerekkel azonosítottunk (Kruppa, K., Türkösi E., Szakács É., Cseh, A., Molnár-Láng, M. 2012. Development and identification of a 4HL.5DL wheat/barley centric fusion using GISH, FISH and SSR markers. Cereal Research Communications. online DOI: 10.1556/CRC.2012.0038). A homozigóta transzlokációs vonal genetikailag stabilnak bizonyult. Morfológiai tulajdonságait (növénymagasság, bokrosodás, fertilitás, kaláshossz, kalásztípus) jellemeztük.

Ez a vonal alkalmas arra, hogy a 4H kromoszóma hosszú karján lokalizált gének hatását és expresszióját a búza genomában tanulmányozzuk. A 4H kromoszómán számos fontos, agronómiai tulajdonságért felelős gén található (szárazságtűrésért felelős gének, vízhasznosítási hatékonyságért felelős gének, dehydrin gének, *Vrn-H2*, Al-tűrésért felelős gének) melynek beépítése a búzába nemesítési szempontból érdekes. Az Asakaze/Manasz kombinációban 2H, 3H, 6H árpa kromoszóma szegmentumokat hordozó transzlokációkat mutattunk ki, melyek felszaporítása folyamatban van.