

AZ ÁRPA SZÁRAZSÁGTŰRÉSÉNEK VIZSGÁLATA: QTL- ÉS ASSZOCIÁCIÓS ANALÍZIS, MARKER ALAPÚ SZELEKCIÓ, TILLING

BÁLINT ANDRÁS FERENC¹, SZIRA FRUZSINA¹, ANDREAS BÖRNER²,
KERSTIN NEUMANN², SVEN GOTTWALD^{2,3} NILS STEIN² és GALIBA GÁBOR¹

¹MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár; ²Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Németország; ³Justus Liebig Universität, Gießen, Németország

A szárazság- és ozmotikus stressztűrést befolyásoló gének azonosítása nehéz feladat, mivel a teszteket több egyedfejlődési fázisban és több független ismétlés felhasználásával kell elvégezni. Munkánk során sikerült árpában 6 olyan lokuszt – kandidált gént – azonosítanunk, melyek több egyedfejlődési fázisban, és több független kísérletben is stabilan befolyásolták az árpa ozmotikus stressz- és szárazságtűrését. A legnagyobb hatást egy, a 7H kromoszóma hosszú karjára térképezett gén mutatta. A génhez kapcsolt markerrel genotipizáltunk egy árpa fajtagyűjteményből véletlenszerűen kiválasztott 40 tavaszi árpa genotípust, amelyeknél két alléltípust sikerült azonosítanunk. Ezeknek a vonalnak az ozmotikus stressztűrését megvizsgálva megállapítottuk, hogy szignifikáns kapcsolat van az alléltípusok előfordulása és a fiatalos ozmotikus stressztűrés között. Mindez arra utal, hogy a nagy sűrűségű EST alapú térképekkel azonosított, ozmotikus-stressztűrést befolyásoló génekhez kapcsolt markerek toleráns genotípusok marker alapú szelekciójára felhasználhatók.

Kulcsszavak: árpa, ozmotikus stressz, szárazságstressz, marker alapú szelekció, TILLING

INVESTIGATION OF DROUGHT TOLERANCE IN BARLEY: QTL- AND ASSOCIATION MAPPING, MARKER ASSISTED SELECTION, TILLING

A. F. BÁLINT¹, F. SZIRA¹, A. BÖRNER², K. NEUMANN², S. GOTTWALD^{2,3}
N. STEIN² and G. GALIBA¹

¹Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár; ²Institut für Pflanzengenetik un Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, Germany; ³Justus Liebig Universität, Giessen, Germany

Identifying of genes affecting osmotic and drought tolerance is really complicated because of the complexity and developmental stage specificity of drought stress. In the work reported here 6 candidate genes affecting drought- and osmotic stress tolerance were identified. The most effective gene was located on the chromosome 7H. This gene was used for genotyping 40 barley lines with unknown osmotic- and drought tolerance. After the phenotyping the phenotype-genotype interaction was investigated, and a significant correlation was found between the allele-composition and the osmotic stress tolerance of the investigated lines. We conclude that the markers linked to the investigated trait and identified with high resolution maps could be used for marker assisted selection for the given trait.

Key words: barley, osmotic stress, drought stress, marker assisted selection, TILLING

Bevezetés

Napjaink egyik legnagyobb kihívása olyan mezőgazdasági növények nemesítése, melyek az abiotikus stresszek – szárazság, magas és alacsony hőmérséklet, UV sugárzás, stb. – károsító hatását jobban elviselik. A szárazság az egyik legnagyobb károkat okozó abiotikus stresszfaktor, mely évről-évre komoly termésvesztéseket okoz a termesztett növényeinknél. Szárazságtűrő fajták nemesítése így kiemelkedően fontos, azonban a jelleg komplexitása miatt nehéz feladat. A szárazságtűrést befolyásoló gének expressziója függhet a növények egyedfejlődési állapotától, így az egyes eltérő fejlődési fázisokban más-más gének játszhatnak szerepet a szárazságtűrés tolerálásában. Hazánkban az árpa fontos termesztett gabona, mely nem csak gazdaságilag jelentős, de egyszerű genomszerkezete miatt modellnövényként is használható a genetikai vizsgálatoknál.

A szárazságtűrés kísérletes tesztelésére számos, irodalomban fellelhető megközelítés létezik. A jelleg komplexitása és a hosszú, költséges felnőtt kori tesztelések miatt az alapkutatással foglalkozó csoportok főként korai egyedfejlődési fázisokban végeznek molekuláris genetikai és élettani vizsgálatokat. Ezek az adatok azonban nem nyújtanak megbízható információt a felnőttkori toleranciáról. A szárazság- és ozmotikus stressztűrést befolyásoló gének azonosítása tehát nehéz feladat: az újabb kutatási eredmények szerint ez a jelleg fejlődési-fázis specifikus, így a teszteket több egyedfejlődési fázisban, nagy számú független ismétléssel kell elvégezni (Szira *et al.*, 2008).

Munkánk célja az árpa szárazságtűrését megbízhatóan befolyásoló gének azonosítása, jellemzése, illetve az azonosított gének segítségével a marker alapú szelekció lehetőségének vizsgálata. Az azonosított kandidált gének funkciójának ellenőrzése céljából elkezdtük egy szárazságtűrést befolyásoló génre mutáns vonalak azonosítását egy árpa TILLING populációban.

Anyag és módszer

Szárazságtűrés kísérleteinkhez 3 árpa (*Hordeum vulgare*) genetikai anyagot használtunk:

1. Oregon Wolfe Barley árpa térképezési populáció, mely 94 DH (*doubled haploid*) vonalból áll, és egymástól genetikailag távol álló szülők keresztezéséből származik. A vonalakat 643 EST (*Expressed Sequence Tags*) alapú markerrel genotipizálták, a markerek közötti átlagos távolság 1.8 cM.

2. ICARDA által összeállított árpa fajtagyűjteményből random kiválasztott 40 tavaszi árpa genotípus.

3. „Barke” sörárpából EMS (*etil-metil-szulfonát*) alapú mutagenézissel előállított TILLING (*Targeting Induced Local Lesion In Genomes*) populáció.

Az első két populáció ozmotikus-stressz- és szárazságtűrését 3 egyedfejlődési fázisban vizsgáltuk meg: 1. csíranövény (8 napos kor), 2. fiatal-növénykor (3 hetes kor), 3. érésig nevelt növények (ebben az esetben mind üvegházban, mind szántóföldön, mind automata öntözési rendszerrel ellátott fóliasátorban végeztünk kísérleteket).

A csíra- és fiatalnövénykori tesztekben vízkultúras rendszerben, poli-etilén-glikol (ozmotikum) kezelés hatására bekövetkező hajtás és gyökérhossz csökkenést vizsgáltuk, míg felnőttkori tesztekben vízmegvonást alkalmaztunk. Minden egyedfejlődési fázisban minimum 3

független ismétlésben végeztünk el tesztek. Munkánk során elsősorban a biomasszaprodukciót (csíra- és fiatalnövénykor), valamint a terméseredményeket vizsgáltuk, de meghatároztuk a virágzási időket, relatív víztartalmakat, és ozmotikus potenciált is. A részletes tesztelési körülmények és az alkalmazott módszerek leírásai megtalálhatók Szira *et al.* (2008) cikkében.

A statisztika analízishez a Statistica 6.0 (2001) szoftvert illetve a Microsoft Excel különböző verzióit használtuk. A QTL (*Quantitative Trait Locus*) analízishez a MapQTL 4.0 (Van Ooijen, 2003) szoftvert használtuk

A TILLING populációban a mutások azonosítására a Comai *et al.* (2006) módszert alkalmaztuk kisebb módosításokkal.

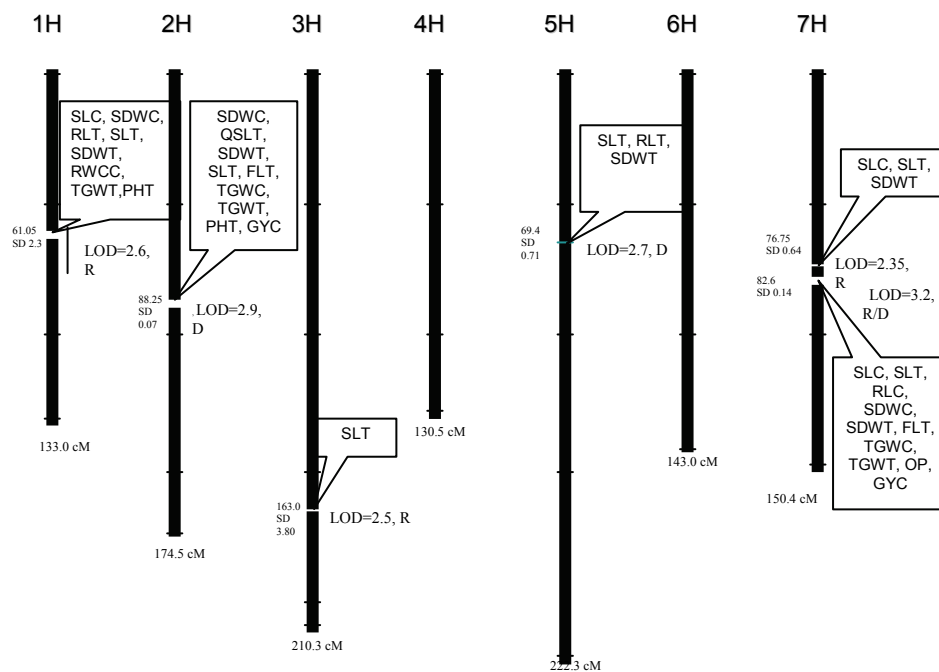
Eredmények és következtetések

Vizsgálataink eredménye szerint mindegyik egyedfejlődési fázisban legalább 4 különböző QTL befolyásolja szignifikánsan a növények ozmotikus stressz- és szárazságtűrését, azonban a csíranövénykorban azonosított lokuszok többsége nem stressz-specifikus, tehát kontroll körülmények között is befolyásolja az adott jelleg megnyilvánulását. Mindegyik egyedfejlődési fázisban más-más QTL gyakorolja a legnagyobb hatást a toleranciára, tehát a jelleg fejlődési fázis specifikusan nyilvánul meg. Nem találtunk korrelációt a szárazság hatására bekövetkező terméseredmény csökkenés és az egyes genotípusok ozmotikus adaptációra való képessége között.

A vizsgált jellegekre elvégzett QTL analízis után mindössze 6 olyan lokuszt (kandidált gént) sikerült azonosítani (1. ábra), melyek több független ismétlésben, ill. több egyedfejlődési fázisban is stabilan befolyásolták az ozmotikus stressz- illetve szárazságtűrést árpában. A legnagyobb hatást a 7H kromoszóma hosszú karjára térképezett gén mutatta, mely minden vizsgált egyedfejlődési fázisban hatással volt a növények toleranciájára.

Eredményeink alapján egyértelmű, hogy a szárazságtűrésre nagy hatást önmagában egy lokusz sem gyakorol (LOD értékek: 2-3 között, fenotípusos varianciára gyakorolt hatás: 15-30 %), ezért megfelelő mértékű toleranciához több allél megfelelő kombinációjú jelenléte szükséges.

Mivel kíváncsiak voltunk arra, hogy az Oregon Wolfe Barley DH vonalaiban azonosított QTL-ek más árpa genetikai háttérben is működnek-e, ezért a 7H kromoszómán azonosított génhez kapcsolt markerrel genotipizáltuk az árpa fajtagyűjteményből véletlenszerűen kiválasztott 40 tavaszi árpa genotípust, amelyeknél két alléltípust sikerült azonosítanunk. Ezeknek a vonaloknak az ozmotikus stressztűrését megvizsgálva megállapítottuk, hogy szignifikáns kapcsolat van az alléltípusok előfordulása és a fiatalkori ozmotikus stressztűrés között. Mindez arra utal, hogy a nagy sűrűségű EST alapú térképekkel azonosított szárazságtűréshez kapcsolt markerek toleráns genotípusok marker alapú szelekciójára felhasználhatók.



1.ábra Az Oregon Wolfe Barley populáció segítségével azonosított ozmotikus stresszt és szárazságtűrését befolyásoló lókuszok. Az egyes lókuszok által befolyásolt tulajdonságok rövidítései a lókusz mellett baloldalt vannak feltüntetve. A LOD értéként a legnagyobb LOD értéket adtuk meg. D (DOM) és R (REC) jelzi, hogy mely szülőtől származik a nagyobb fenotípusos értéket adó allél. Rövidítések: SLC: kontroll hajtáshossz, SLT: kezelt hajtáshossz, SDWC: kontroll hajtásszáraztömeg, SDWT: kezelt hajtás száraztömeg, RLC: kontroll gyökérhossz, RLT: kezelt gyökérhossz, RWCC: kontroll relatív víztartalom, TGWC: kontroll ezerszemtömeg, TGWT: kezelt ezerszemtömeg, PHT: kezelt növénymagasság, FLT: virágzási idő, OP: ozmotikus potenciál, GYC: kontroll termés.

Korábbi vizsgálataink alapján nagy hatást gyakorolt az ozmotikus stressztűrésre az árpaiban nemrég jellemzett *nud* gén (Taketa *et al.*, 2008), mely a sötétűrészt és a dormanciát is befolyásolja (Weidner és Lohwasser személyes közlés). A gén hatásának vizsgálata céljából megkezdtük mutánsok izolálását az árpa TILLING populációban.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a MÖB-DAAD 2005-2006, A GVOP-3.11-2004-05-0441/3.1, a Német-Magyar PlantResource projekt (PlantResource Phase I, Nap-Bio) és az AGRISAFE pályázat támogatta.

Irodalom

Comai, L. *et al.* (2006) TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J* 45, 684-694.

- StatSoft, Inc., 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6.0., www.statsoft.com.
- Szira, F. *et al.* (2008) Evaluation of drought-related traits and screening methods at different developmental stages in spring barley. *J Agron Crop Sci.* 194, 334-342.
- Taketa, S. *et al.* (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *PNAS*, 105, 4062-4067.
- Van Ooijen, J.W., 2003. MapQTL® 5, Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.