

## A GABONAFÉLÉK EGYEDFEJLŐDÉSÉT ÉS KALÁSZOLÁSÁT MEGHATÁROZÓ GENETIKAI KOMPONENSEK TANULMÁNYOZÁSA

KARSAI ILDIKÓ<sup>1</sup>, MÉSZÁROS KLÁRA<sup>2</sup>, KŐSZEGI BÉLA<sup>3</sup>, PATRICK M. HAYES<sup>4</sup>,  
BEDŐ ZOLTÁN<sup>2</sup> ÉS VEISZ OTTÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kalászos Gabona Rezisztencia Nemesítési Osztály; <sup>2</sup> Kalászos Gabona Nemesítési Osztály; <sup>3</sup> Fitotron Osztály; <sup>4</sup> Dept. of Crop and Soil Science, OSU, Corvallis, USA

### **Bevezetés**

Az egyedfejlődés szabályozása nemcsak a télállóságot és a kalászolási időt szabja meg alapvetően, hanem a földrajzi adaptációt és a természetesség határait, valamint az abiotikus stresszekhez való alkalmazkodás módját is. Erre a tényre alapozva kiterjedt kutatási programot folytattunk a gabonafélék, elsősorban az árpa és a búza egyedfejlődését és virágzási idejét meghatározó genetikai komponensek tanulmányozására. Kutatásainkban egyesítettük a fitotron kínálta részletes növényosztályú vizsgálatok lehetőségeit a molekuláris genetika által nyújtott modern eszköztárral.

Elkészítettük két árpa térképező populáció funkcionális marker kapcsoltsági térképét, amelyekben génspecifikus primerek alkalmazásával több egyedfejlődési főgént, mint markert is térképeztünk. Meghatároztuk a vernalizációs igény és a nappalhossz érzékenység génjeinek az egyedfejlődés szabályozásában betöltött szerepét, azonosítottuk a működésüket befolyásoló főbb környezeti tényezőket, valamint feltártuk a gének közti környezetfüggő kapcsolatrendszerét. Az egyedfejlődést meghatározó egyéb környezeti tényezők további tanulmányozására vadfajokat, valamint különböző eredetű árpa és búzafajtákat is kísérletekbe vontunk, jellemezve e fajták vernalizációs igényét, nappalhossz-, fényintenzitás- és hőmérséklet érzékenységét, valamint ezek genetikai alapjait.

### **Kutatási háttér**

A gabonafélék virágzásszabályozásának legfőbb komponensei a vernalizációs igény, nappalhossz érzékenység és a szűkebb értelemben vett koraiság, amelyek tanulmányozása hosszú múltra vezethető vissza. Jelentősebb áttörés azonban csak az utóbbi egy évtizedben született a vernalizációs igény és a nappalhossz érzékenység főbb génjeinek azonosítása, szekvenciáik meghatározása és a valószínűsíthető funkcionális polimorfizmusok igazolása révén. A virágzási idő variabilitásának jelentős arányát kitevő – szűkebb értelemben vett – koraiság genetikájáról azonban jóval kevesebb információ áll rendelkezésre. Feltételezhetően számos ilyen kihatású virágzási gén van jelen a gabonafélék genomjaiban, amelyek működését az egyes környezeti tényezők (fényintenzitás, a fény spektrális összetétele, környezeti hőmérséklet) egyedi módon befolyásolhatják, hozzájárulva a virágzási idő finomszabályozásához.

Kísérleteinkkel annak megállapítása volt a célunk, hogy (1) a vernalizációs igény (*VRN1*, *VRN2*, és *VRN3*), valamint a nappalhossz érzékenység (*PPD1* és *PPD-H2*) eddig azonosított főgénjei milyen szerepet játszanak a gabonafélék virágzásszabályozásában, (2) a különböző környezeti tényezők milyen mértékben befolyásolják és módosítják e gének működését és az alléljaik közti kölcsönhatásokat. Célul tűztük ki továbbá (3) a szűkebb értelemben vett koraiság genetikai hátterének tanulmányozását is. Egyrészt a virágzásszabályozásban szerepet játszó, a vernalizációs igényen és a nappalhossz érzékenységen kívüli egyéb virágzási gének azonosítása céljából, másrészt hosszabb távon a gyakorlati nemesítés számára szorosan kapcsolt molekuláris markerek kifejlesztése érdekében.

### Árpában végzett kísérleteink (1994-2008)

Nemzetközi együttműködés keretében részt vettünk egy fakultatív x tavaszi árpa térképező populációval végzett kísérletben, melynek célja a télállósággal összefüggő tulajdonságok genetikai tanulmányozása volt (Pan és mtsai, TAG., 89(1994):900). A vernalizációs igény (*VRN-H1*, *VRN-H2*, *VRN-H3*) és a nappalhossz érzékenység (*PPD-H1*, *PPD-H2*) génjeire szerkesztett specifikus primerek segítségével térképeztük ezeket a géneket két árpa populációban, amely a funkcionális QTL elemzés alapját biztosította (Szűcs és mtsai, 2008, Karsai és mtsai, 2007a). A vernalizációs igény (*VRN-H1*) és a nappalhossz érzékenységet felelős (*PPD-H1*) lókuszok virágzásra kifejtett hatását elemeztük részletesen QTL dinamikai vizsgálatok alkalmazásával (Karsai és mtsai, TAG, 94(1997):612). E vizsgálatokat kiterjesztettük egy fakultatív x őszi árpa populációra is, amelyben azonosítottuk és jellemeztük a *VRN-H2* vernalizációs igény génjét és működési hatásmechanizmusát (Karsai és mtsai, 2005). Az elsők között bizonyítottuk be, hogy a *VRN-H2* aktivitását nemcsak a vernalizáció, hanem a nappalhossz is szignifikánsan befolyásolja (Karsai és mtsai, 2005, Karsai és mtsai, 2006, Szűcs és mtsai, 2006). Genetikai vizsgálatokban igazoltuk, hogy a *VRN-H1* és *VRN-H2* lókuszok allél összetétele és a köztük fennálló episztatikus kölcsönhatások alapvetők a vernalizációs igény meghatározásában (Kóti és mtsai, 2006, Szűcs és mtsai, 2007). A földrajzi adaptációt meghatározó tulajdonságok tanulmányozására bevontunk vadfajokat, valamint különböző eredetű árpafajtákat is, jellemezve e genotípusok vernalizációs igényét, nappalhossz érzékenységét (Karsai és mtsai, 2001, Karsai és mtsai, 2004), valamint meghatároztuk allél összetételüket a *VRN-H1*, *VRN-H2* és a *PPD-H1* génekre (Mészáros és mtsai, 2004).

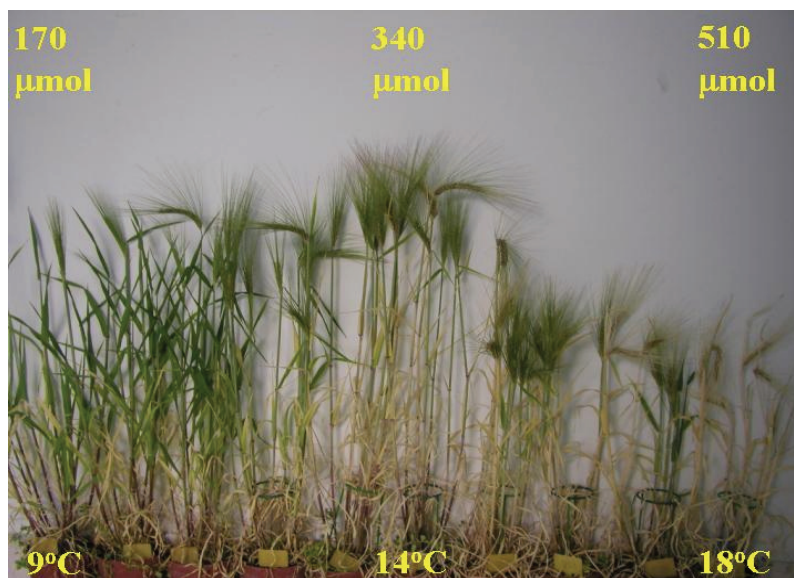
Megállapítottuk, hogy a vernalizációs igény és hosszú nappalos érzékenység telítődését követően számos egyéb környezeti tényező is szignifikánsan befolyásolja a kalászolást (1. ábra). Ezek közül a környezeti hőmérséklet, valamint a napi fluktuációt mutató tényezők (fény és hőmérséklet ciklus) alapvető és elsődleges szerepet játszanak az egyedfejlődés meghatározásában, míg a fényintenzitás a többi környezeti tényezővel

összefüggésében fejt ki befolyásoló hatását (Karsai és mtsai, 2007b). Az árpa térképező populációk szülői fajtáinak kalászásai sajátosságait jellemezve kontrollált körülmények között megállapítottuk, hogy ezek a fajták a környezeti hőmérsékleti kezelésre nyújtott reakcióikban is különböztek egymástól, amely a kalászás idő szempontjából optimálisnak számító hőmérsékleti szinteknél magasabb hőmérsékleten volt a legkifejezettebb (Karsai és mtsai, 2008a). Kísérleteink feltárták azt is, hogy a fajták leggyorsabban konstans körülmények (folyamatos megvilágítás, állandó hőmérséklet) között kalásztak ki. A napi fény ciklus alkalmazása jelentősen késleltette a kalászást, és ezt a hatást a napi hőmérséklet ciklus párhuzamos alkalmazása még tovább fokozta. A fluktuáló környezeti tényezőkre adott reakció életforma függőnek bizonyult (Karsai és mtsai, 2008a).

Klímakamrás kísérletekben elemeztük a két árpa populáció kalászását konstans körülmények között, valamint napi fény, és hőmérsékleti ciklikusság mellett (Karsai et al 2008b). Kimutattuk, hogy a napi fluktuációt mutató tényezők jelentősen befolyásolják az általunk vizsgált egyedfejlődési gének működését, valamint az alléljaik közti kölcsönhatás mikéntjét is alátámasztva, hogy ezek a gének a nappalhossz és alacsony hőmérsékletű vernalizációs szabályozás mellett és attól részben függetlenül különböző módon vesznek részt a cirkadián szabályozásban vagy cirkadián szabályozás alatt is állnak. Ebben a folyamatban kiemelendő a *VRN-H1*, *VRN-H2*, *PPD-H1* és a *PPD-H2* gének szerepe és feltételezhető funkciói. A *PPD-H1* és a *VRN-H1* gének közti szoros, allél-függő kölcsönhatás a cirkadián szabályozás során még kifejezettebbé vált. A szülői alléloktól eltérő új kombinációk új egyedfejlődési típusokat eredményeztek, amelyek a különböző környezeti feltételrendszerre is jelentősen eltérő, sajátos reakciót mutattak. A *PPD-H2* gén nemcsak rövid nappalon befolyásolta a kalászást, hanem hosszú nappalon is, a fény és hőmérséklet ciklus párhuzamos alkalmazásakor. Szerepe ekkor azonban már jelentősen függött a *PPD-H1* és a *VRN-H1* gének alléles összetételétől. Csak az érzéketlen *PPD-H1* allél és az őszi *VRN-H1* allél együttes előfordulásakor vált a virágzás központi meghatározó génjévé, amikor a *PPD-H2* gén hiánya a kikalászás képességének megszűnésével járt együtt. Eredményeink alapján a *PPD-H2* nemcsak a nappalhossz szabályozásban működik közre, hanem a cirkadián ritmusnak a külső környezethez történő szinkronizálási folyamatában is, nagy valószínűséggel, mint közvetítő a cirkadián ritmus és a *VRN-H1* gén között.

### **Búzában végzett kísérleteink (2006-2008)**

Kísérleteink célja az Mv Toborzó fajta extra koraiságát eredményező genetikai komponensek feltárása, valamint az egyedi reakciót kiváltó környezeti tényezők azonosítása volt. Ennek érdekében kereszteztük az Mv Toborzót nyolc, eltérő ökológiai körülmények között szelektált búzafajtaival.



1. ábra. Dicktoo árpafajta fejlődése hőmérséklet (9–18°C) és fényintenzitás (170–510  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) gradiens párhuzamos alkalmazása mellett.

Inhomogén kamrában 13–22°C közti hőmérséklet gradiens alkalmazásával meghatároztuk a fajták hőmérséklet reakcióit. Ebben a hőmérséklet tartományban a búzafajták többsége a magasabb hőmérsékletre a kalászolási idő lerövidülésével reagált. A nappalhossz érzéketlensége mellett az Mv Toborzó egyben legkevésbé volt érzékeny a hőmérsékletváltozásra is. Alacsony hőmérsékleten ez a fajta kalászolt ki legkorábban, valamint a hőmérséklet emelkedésével ennél a fajtánál volt a kalászolási idő csökkenése a legkisebb mértékű. Az inhomogén gradiens kísérlet eredményei szoros korrelációban álltak a fajták szántóföldi vetésidőben mért kalászolási idő eredményeivel. Az Mv Toborzó a többi fajtánál szignifikánsan korábban kalászolt ki, ezt követte néhány napos késéssel a többi *PPD-D1* génben nappalhossz érzéketlenségi allélt hordozó fajta. Az érzékeny allélt tartalmazó fajták kalászolása volt szignifikánsan a legkésőbbi.

Az Mv Toborzó és a 8 fajtával létrehozott  $F_1$  és  $F_2$  populációk szántóföldi kalászolási eredményei alapján megállapítottuk, hogy a populációk kalászolási folyamatos gyakorisági eloszlásokat mutattak, és a kalászolási átlagértékeket alapvetően az adott populáció szülő fajtáinak *PPD-D1* lokusz allél összetétele határozta meg. Az érzéketlen  $\times$  érzékeny populációk mindegyikében az  $F_1$  és az  $F_2$  nemzedék átlagos kalászolása a két szülő kalászolásának átlagával megegyezően azonos volt. A csak érzéketlen allélt tartalmazó populációkban az  $F_1$  átlaga a későbbi szülőével volt megegyező, és az  $F_2$  átlagosan korábban kalászolt ki. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az Mv Toborzó koraiságáért alapvetően egy (vagy néhány) recesszív gén felelős, amelynek hatását a *PPD-D1* érzékeny allélja elnyomja.

Két érzéketlen × érzékeny populáció esetében (Mv Toborzó × Mv Verbunkos, Mv Toborzó × Tommi) gén-allél specifikus primerek felhasználásával jellemeztük az F<sub>2</sub> egyedi növények *PPD-D1* allél összetételét is. A gén allél arányok egyik populációban sem tértek el szignifikánsan a várt 1:2:1 hasadási aránytól, lehetővé téve a *PPD-D1* lókuszt kalászásra, növénymagasságra és néhány agronómiai jellemzőre kifejtett szerepének vizsgálatát. A *PPD-D1* gén mindkét populációban szignifikánsan befolyásolta a kalászásra való időt és a növénymagasságot; az érzéketlen allél átlagosan korábbi kalászást és alacsonyabb növényeket eredményezett. Hatásának mértéke azonban populációfüggő volt. Mindkét populációban a heterozigóta egyedek kalászásra való ideje szignifikánsan későbbi volt, mint a homozigóta érzéketlen allélú egyedeké. Ennek ellenére átlagos kalászásuk közelebb állt ehhez a csoporthoz, mint a homozigóta érzékeny csoport átlagához, alátámasztva az érzéketlen allél részleges dominanciáját az érzékeny fölött. Mindkét populációban a homozigóta érzéketlen egyedek (Toborzó allél) szignifikánsan későbbi kalászásúak voltak, mint az Mv Toborzó fajta, valamint ugyanaz az érzéketlen Toborzó allél az eltérő genetikai háttérben eltérő kalászásra való időt eredményezett. Ezek az eredmények megerősítették a fenotípusos adatok alapján levont következtetéseket, miszerint a kalászásra való idő egyéb kisebb hatású génjei is hasadást mutatnak ezekben a populációkban.

### **Kutatásaink további iránya (2008-2011)**

Gabonafélékben a környezeti tényezők közül a (nem vernalizáló szintű) hőmérsékletnek a virágzás genetikai szabályozását befolyásoló hatása a legkevésbé tanulmányozott. Egy elnyert OTKA pályázat keretében vizsgáljuk az optimálisnál alacsonyabb és magasabb hőmérsékletek, valamint a napi fluktuáló tényezők virágzásra kifejtett hatását. Tanulmányozzuk az optimálisnál alacsonyabb és magasabb hőmérsékletre jelentkező érzékenység, a hőmérséklet kompenzáció mértékét; a főbb egyedfejlődési gének vernalizáció és nappalhossz független szabályozását, a gének közti kölcsönhatás rendszert; a hőmérséklet érzékelésében szerepet játszó egyéb kromoszóma régiókat; a búza és az árpa virágzás szabályozásában jelentkező különbségek genetikai alapjait; valamint a fajták egyedfejlődési főgén haplotípusai és a földrajzi elterjedésük közti kapcsolatot. Ennek érdekében két-szülős, valamint sok fajtás árpa és búza populációkon végzett klímakamrás kísérleteket és molekuláris genetikai vizsgálatokat végzünk. A kutatás eredményeként várható új szabályozó gének, szabályozási folyamatok azonosítása; a genetikai források hatékonyabb felhasználása fajta előállításban; valamint markeren alapuló szelekció kidolgozása.

**Köszönetnyilvánítás**

Munkánkat az NKFP 4/0020/2002; az OTKA T026285; a MAKA JF 520; az OTKA NK 72913; az OTKA K 63369 és az EU-FP7-Regpot 2007-1 keretprogram, AGRISAFE 203288 sz. pályázatok támogatták.

**Megjelent publikációk**

- Karsai, I., Hayes, P. M., Kling, J., Matus, I. A., Mészáros, K., Láng, L., Bedő, Z., Sato, K. (2004): Genetic variation in component traits of heading date in *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* accessions characterized in controlled environments. *Crop Science*, **44**, 1622–1632.
- Karsai, I., Kőszegi, B., Kovács, G., Szűcs, P., Mészáros, K., Bedő, Z., Veisz, O. (2008a): Effects of temperature and light intensity on flowering of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Biologica Hungarica*, **59**, 205–212.
- Karsai, I., Mészáros, K., Láng, L., Hayes, P. M., Bedő, Z. (2001): Multivariate analysis of traits determining adaptation in cultivated barley. *Plant Breeding*, **120**, 217–222.
- Karsai, I., Mészáros, K., Szűcs, P., Hayes, P. M., Láng, L., Bedő, Z. (2006): The *Vrn-H2* locus (4H) is influenced by photoperiod and is a major determinant of plant development and reproductive fitness traits in a facultative × winter barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Plant Breeding*, **125**, 468–472.
- Karsai, I., Mészáros, K., Kőszegi, B., Bedő, Z., Veisz, O. (2007b): Effect of combinations of light intensity and photoperiod on heading date of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agronomica Hungarica*, **55**, 397–406.
- Karsai, I., Szűcs, P., Mészáros, K., Puskás, K., Bedő, Z., Veisz, O. (2007a): Barley (*Hordeum vulgare* L.) marker linkage map; a case study of various marker types and of mapping population structure. *Cereal Research Communications*, **35**, 1551–1562.
- Karsai, I., Szűcs, P., Kőszegi, B., Hayes, P. M., Casas, A., Bedő, Z., Veisz, O. (2008b): Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2707–2715.
- Karsai, I., Szűcs, P., Mészáros, K., Filichkina, T., Hayes, P. M., Skinner, J. S., Láng, L., Bedő, Z. (2005): The *Vrn-H2* locus is a major determinant of flowering time in a facultative × winter growth habit barley (*Hordeum vulgare* L.) mapping population. *Theoretical and Applied Genetics*, **110**, 1458–1466.
- Kóti, K., Karsai, I., Szűcs, P., Horváth, C., Mészáros, K., Kiss, G. B., Bedő, Z., Hayes, P. M. (2006): Validation of the two-gene epistatic model for vernalization response in a winter × spring barley cross. *Euphytica*, **152**, 17–24.
- Mészáros, K., Karsai, I., Hayes, P. M., Láng, L., Bedő, Z. (2004): Genetic Study of Adaptational Traits in a Set of Winter Barley Varieties (*Hordeum vulgare* L.) Using Molecular Markers. *Proceedings of the 9th International Barley Genetics Symposium*, Brno, Czech Republic, 20-26. June 2004., pp. 308-313.
- Szűcs, P., Karsai, I., von Zitzewitz, J., Cooper, L. D. D., Gu, Y. Q., Chen, T. H. H., Hayes, P. M., Anderson, O., Skinner, J. S. (2006): Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 1277–1285.
- Szűcs, P., Skinner, J. S., Karsai, I., Cuesta-Marcos, A., Haggard, K. G., Corey, A., Chen, T. H. H., Hayes, P. M. (2007): Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for a continuum of vernalization sensitivity. *Molecular Genetics and Genomics*, **277**, 249–261.