

ÁRPA KROMOSZÓMÁK AZONOSÍTÁSA ÚJ BÚZA X ÁRPA HIBRIDEK UTÓDVONALAIBAN *IN SITU* HIBRIDIZÁCIÓ ÉS SSR- MARKEREK SEGÍTSÉGÉVEL

KRUPPA KLAUDIA, CSEH ANDRÁS ÉS LÁNGNÉ MOLNÁR MÁRTA

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

Az 'Asakaze komugi' búzafajta és 'Manasz' árpafajta keresztezéséből létrehozott hibridből származó diszómás addíciós vonalakban azonosítottuk az árpa kromoszómákat fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) és molekuláris markerekkel. A búza genomban az árpa kromoszómák jelenlétét genomi *in situ* hibridizációval (GISH) mutattuk ki, melyhez teljes árpa genomi DNS-t jelöltünk. A 2H, 4H, 6H és 7H diszómás addíciós vonalakban az árpa kromoszómákat négy repetitív DNS próba kombinálásával (HvT01-GAA, Afa family-HvT01-pTa71) kidolgozott FISH mintázat alapján azonosítottuk. A citológiai meghatározást mikroszatellit markerekkel is megerősítettük, melynek során tizennégy simple sequence repeat (SSR)-markert teszteltük. Az *in situ* hibridizáció és a molekuláris markerek kombinálása lehetővé tette a különböző vonalak egyértelmű azonosítását.

Kulcsszavak: búza-árpa addíciós vonalak, genomi *in situ* hibridizáció, fluoreszcens *in situ* hibridizáció, SSR markerek

IDENTIFICATION OF BARLEY CHROMOSOMES IN DERIVATIVES OF NEW WHEAT/BARLEY HYBRIDS USING *IN SITU* HYBRIDIZATION AND SSR MARKERS

K. KRUPPA, A. CSEH, M. MOLNÁR-LÁNG

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

The aim of this study was to identify the barley chromosomes in new wheat-barley disomic addition lines produced in Martonvásár and developed from hybrids between facultative wheat ('Asakaze komugi') and a Ukrainian six-rowed winter barley cultivar ('Manas'). The barley chromosomes were detected by genomic *in situ* hybridization (GISH) using labelled genomic barley DNA. The disomic addition lines 2H, 4H, 6H and 7H were identified by FISH using different combinations of repetitive DNA probes: HvT01-GAA and HvT01-pTa71-Afa family. Fourteen SSR markers were used to confirm the results of the cytological identification. The combination of *in situ* hybridization and the use of molecular markers made it possible to identify the different lines unequivocally.

Key words: wheat-barley addition lines, genomic *in situ* hybridization, fluorescent *in situ* hybridization, SSR markers

Bevezetés

A búza x árpa hibridek létrehozása lehetőséget nyújt arra, hogy a két faj kedvező tulajdonságait az utódokban egyesítsük.

Az első búza × árpa hibridet Dániában Kruse (1973) hozta létre. Néhány évvel később a genetikai modellnek számító tavaszi búza ('Chinese Spring') és tavaszi árpa ('Betzes') keresztezéséből előállított addíciós sorozatról számoltak be Ausztráliában (Islam et al. 1978).

A két genom közti nagymértékű inkompatibilitás miatt nagyon nehéz feladat a termesztett árpafajtákkal az új búza × árpa hibridek létrehozása, amely viszont lehetővé tenné az agronómiai szempontból fontos gének átvitelét. Martonvásáron eddig négy árpafajtával sikeresen állítottunk elő búza × árpa hibrideket, melyek közül a Betzes és az Igrí árpafajtákkal létrehozott hibridek utódaiban az árpa kromoszómák kimutatásáról már korábban beszámoltunk (Szakács and Molnár-Láng, 2007). Gyakorlati szempontból nagyon jelentős eredmény a Manasz ukrán hatsoros őszi árpafajta bevonása a hibridek előállításába, miután az a magyarországi éghajlati viszonyokhoz jobban adaptálódott, mint az Igrí és a Betzes német árpafajták.

Anyag és módszer

A japán 'Asakaze komugi' fakultatív búzafajta (*Triticum aestivum* L.; $2n=6x=42$; AABBDD) és az ukrán 'Manasz' hatsoros termesztett őszi árpafajta (*Hordeum vulgare* L.; $2n=2x=14$; HH) keresztezéséből előállított hibridből (Molnár-Láng et al., 2000) származó búza/árpa diszómás addíciós vonalakat (Molnár-Láng et al., 2005) elemeztük FISH-sel és molekuláris markerekkel.

Az *in situ* hibridizációhoz a kromoszómapreparátumokat a gyökérsúcsból a Jiang et al. (1994) által leírt módszer alapján készítettük. A FISH során alkalmazott repetitív DNS próbák (Afa- family, Nagaki et al. 1995; GAA, Pedersen és Langridge 1997; HvT01, Schubert et al. 1998; pTa71, Gerlach és Bedbrook 1979) előállítását Sepsi et al. (2008) módszere szerint végeztük. A próba jelöléshez digoxigenin-11-dUTP-t (Roche) és biotin-16-dUTP-t (Roche) használtunk. A hibridizációs jeleket anti-digoxigenin-Rhodamine (Roche) és streptavidin-FITC (Roche) felhasználásával tettük láthatóvá. A FISH preparátumok előkezelési és mosási lépéseit Molnár-Láng et al. (2000) szerint hajtottuk végre, majd az *in situ* hibridizációt Molnár et al. (2009) leírása alapján végeztük. A FISH jeleinek lemosása után a GISH-t ugyanazon a tárgylemezen alkalmaztuk. Próbaként fluorogreennel (Fluorescein-11-dUTP, Amersham Biosciences Europe GmbH, Germany) jelölt árpa genomi DNS-t használtunk, míg blokkolóként jelöletlen búza genomi DNS-t alkalmaztunk 1:35 arányban. A hibridizáció lépései megegyeztek a FISH során alkalmazottakkal.

Az SSR-markerekkel történő vizsgálatokhoz genomi DNS-t izoláltunk az addíciós vonalakból valamint a szülői partnerekből ChargeSwitch gDNA Plant Kit (Invitrogen, USA) alkalmazásával. Az alkalmazott Bmac0134, Bmag0125, Ebsmac0415, Bmag0009, Bmac0040, HvLTPPB, Bmag0021, Bmac0156, HvID, Bmag0120 (Ramsay et al., 2000), HvM36, HvM40, HvM67, HvM4 (Liu et al., 1996) markerek analízise Cseh et al. (2009) módszere alapján történt.

Eredmények és következtetések

Búza/árpa addíciós vonalakban az árpa kromoszómák kimutatása GISH-sel történt. A jelölt árpa DNS az árpa kromoszómákhoz hibridizált, így az árpakromoszómák fluoreszcensen jelölődtek, a búza kromoszómák jelöletlenek maradtak. (1. ábra.)

A kromoszómák azonosítását a FISH során alkalmazott jelölt repetitív DNS szekvenciák mintázata alapján végeztük. A HvT01 próba a búza 4B kromoszómájának kivételével csak az árpa kromoszómák telomériához hibridizál de a 2H és az 5H kromoszómán csak a rövid karon ad jelet. A GAA próba a centromérához közeli régiókban mutat kromoszóma-specifikus mintázatot.

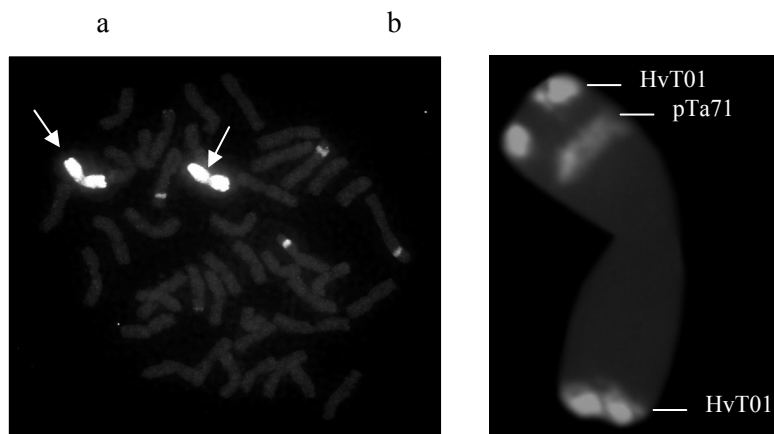
A GAA és HvT01 próbák kombinációjával a 2H kromoszóma jelenlétét igazoltuk. A GAA próbával a 2H kromoszóma mindkét karján két intersticiális sáv jelenik meg, míg a HvT01 próba a rövid kar disztális részéhez hibridizál. A Bmag0125 és az Ebmac0415 SSR marker segítségével sikerült a hosszú kar jelenlétét igazolni, de a rövid kar általunk vizsgált (Bmac0134, HvM36) markerei nem bizonyultak alkalmasnak a Manasz 2HS kromoszómakar vizsgálatára.

A GAA próba hibridizációja során az árpa kromoszómák közül a 4H kromoszóma jelölődik a legintenzívebben. A centroméra közeli régiókban erős hibridizációs jelet mutat mindkét kromoszóma karon. HvT01 próbával kombinálva mutattuk ki a 4H diszómás addíciós vonalakat. A 4H kromoszóma rövid karjára térképezett HvM40- és a hosszú karon lokalizált HvM67 markerek megbízhatóan mutatták az árpa kromoszóma jelenlétét.

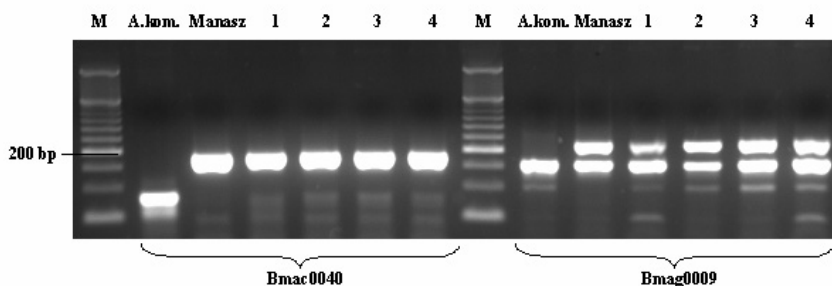
A pTa71 próba elsősorban a szatellittel rendelkező kromoszómák NOR-régiójához valamint az 1H és 7H árpa kromoszómákhoz hibridizál. A pTa71 és HvT01 egyidejű használatával egyes vonalakban egy pár 6H kromoszómát azonosítottunk (1. ábra), majd Bmac0040 (6HL) valamint Bmag0009 (6HS) SSR-markerekkel megerősítettük a kromoszóma jelenlétét (2. ábra.).

A 7H kromoszómák kimutatásához Afa-family-HvT01-pTa71 próbák kombinációját alkalmaztuk a multicolour FISH során. Afa mintázata a centromer régióban más árpa kromoszómáktól jól elkülöníthető volt, a pTa71 a rövid karon halvány jelet adott, a HvT01 próba mindkét karon telomérás jelet adott. Az öt alkalmazott mikroszatellit marker (HvM4, Bmag0021, Bmac0156, HvID, Bmag0120) közül a Bmag0120 és a Bmac0156 markerrel végzett vizsgálat során nem teljesen azonos méretű termék keletkezett a 'Manasz' szülőpartnerben, mint az addíciós vonalakban, melynek okát egyelőre nem ismerjük. A HvID marker a hosszú kar-, a Bmag0021 a rövid kar jelenlétét egyértelműen bizonyította.

A vizsgált SSR markerek alkalmazásával gyorsan és pontosan kimutathatók a Manasz kromoszómák az addíciós vonalainkban. A vonalak diszómás jellegének kimutatásához továbbra is nélkülözhetetlen az *in situ* hibridizáció. FISH-sel, négy különböző repetitív próba felhasználásával és SSR markerek segítségével egyértelműen azonosíthatók a kromoszómák.



1. ábra. **a**, Árpa kromoszómák kimutatása GISH-sel. A két jelölődött (világos) kromoszóma az árpa kromoszómapár (nyilak). **b**, A 6H árpakromoszóma FISH mintázata HvT01 és pTa71 repetitív próbákkal.



2. ábra. 6H árpakromoszóma hosszú- és rövid karjának kimutatása Asakaze komugi × Manasz hibrid utódjainak addíciós vonalaiban (1-4) Bmac0040 és Bmag009 SSR markerekkel.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat a Generation Challenge Program SP3 G4007.23, az OTKA K75381 és az AGRISAFE 203288 sz. EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázatok támogatták.

Irodalom

- Cseh, A., Kruppa, K., Molnár, I. (2009): Incorporation of a winter barley chromosome segment into cultivated wheat and its characterization with GISH, FISH and SSR- markers. *Cereal Res. Commun.* **37**. accepted
- Gerlach, W.L., Bedbrook, J.R. (1979): Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1869–1885.
- Islam, A. K. R. M., Shepherd, K. W., Sparrow, D. H. B. (1978): Production and characterization of wheat:barley addition lines. *Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium*. Indian Society of Genetics and Plant Breeding. New Delhi, India. pp. 356-371.

- Jiang, J., Friebe, B., Gill, B. S. (1994): Chromosome painting of Amigo wheat. *Theor. Appl. Genet.* **89**, 811-813
- Kruse, A. (1973): *Hordeum x Triticum* hybrids. *Hereditas* **73**, 157-161
- Liu, Z. W., Biyashev, R. M., Saghai Maroof, M. A. (1996): Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* **93**, 869-876.
- Molnár, I., Benavente, E., Molnár-Láng, M. (2009): Detection of intergenomic chromosome rearrangements in irradiated *Triticum aestivum* – *Aegilops biuncialis* amphiploids by multicolour genomic in situ hybridization. *Genome* **52**, 156-165.
- Molnár-Láng, M., Linc, G., Logojan, A., Sutka, J. (2000): production and meiotic pairing behaviour of new hybrids of winter wheat (*Triticum aestivum*) x winter barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* **43**, 1045-1054.
- Molnár-Láng, M., Novotny, C., Linc, G., Nagy, D. E. (2005): Changes in the meiotic pairing behaviour of a winter wheat- winter barley hybrid maintained for a long term in tissue culture, and tracing the barley chromatin in the progeny using GISH and SSR markers. *Plant Breeding* **124**, 247-251
- Nagaki, K., Tsujimoto, H., Isono, K., Sasakuma, T. (1995): Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among *Triticeae*. *Genome* **38**: 479-486.
- Pedersen, C., and Langridge, P. (1997): Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome* **40**: 589-593.
- Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveesson S, Morgante M, Massari A, Maestri E, Marmiroli N, Sjakste T, Ganai M, Powell W, Waugh R. (2000): A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* **156**. 1997-2005.
- Schubert, I., Shi, F., Fuchs, J., and Endo, T.R. (1998): An efficient screening for terminal deletions and translocations of barley chromosomes added to common wheat. *Plant Journal* **14**: 489-495.
- Sepsi, A., Molnár, I., Szalay, D., and Molnár-Láng, M. (2008): Characterization of a leaf-rust resistant wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using sequential multicolor GISH and FISH. *Theor. Appl. Genet.* **116**. 825-834.
- Szakács, É., Molnár-Láng, M. (2007): Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat – winter barley ('Martonvásári 9 kr1' – 'Igri') disomic addition lines. *Genome* **50**, 43-50.