

A BÚZA CITOGENETIKAI ALAPANYAGOK FENNTARTÁSA SORÁN LÉTREJÖTT KROMOSZÓMA-ÁTRENDÉZŐDÉSEK KIMUTATÁSA *IN SITU* HIBRIDIZÁCIÓVAL

SZAKÁCS ÉVA ÉS LÁNGNÉ MOLNÁR MÁRTA

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

Munkánk során hazai és külföldi génbankokból származó, éveken át fenntartott Chinese Spring/Imperial diszómás addíciós vonalak genetikai stabilitását vizsgáltuk fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) segítségével. Kimutattuk, hogy az addicionálódott rozs kromoszómák eltérő stabilitással rendelkeznek a búza háttérben. A legnagyobb stabilitást a 7R addíciós vonal mutatta, valamennyi vizsgált utódnövény diszómás volt. A többi vonal utódnövényei között eltérő arányban találtunk diszómásakat, monoszómásakat és teloszómásakat ill. olyanokat, melyekből a rozs kromoszóma teljesen eliminálódott. A repetitív DNS-próbák specifikus hibridizációs mintázata alapján kromoszóma-átrendeződéseket is kimutattunk. Izokromoszómákat figyeltünk meg az 1R és a 4R addíciós vonalban. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a fontos genetikai alapanyagok instabilitásuk miatt folyamatos citológiai kontrollra szorulnak. Az ellenőrzésre használt FISH módszer előnye, hogy segítségével olyan kromoszóma-átrendeződések is láthatóvá válnak, melyek nem mutathatók ki sem a hagyományos Feulgen festési eljárással, sem molekuláris markerekkel.

Kulcsszavak: CS/Imperial addíciós vonalak, FISH

IN SITU HYBRIDISATION FOR THE DETECTION OF CHROMOSOME REARRANGEMENTS FORMED DURING THE MAINTENANCE OF CYTOGENETIC WHEAT MATERIALS

É. SZAKÁCS, M. MOLNÁR-LÁNG

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

The genetic stability of Chinese Spring/Imperial disomic addition lines originating from Hungarian and foreign gene banks and maintained for long periods was checked using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). The added rye chromosomes were found to have diverse levels of stability in the wheat background. The greatest stability was observed for the 7R addition line, where all the progeny plants tested were disomic. Varying proportions of disomic, monosomic and telosomic plants were found among the progeny of the other lines, while the rye chromosome had been completely eliminated from some plants. Based on the specific hybridisation patterns of the repetitive DNA probes, chromosome rearrangements were also detected. Isochromosomes were observed in the 1R and 4R addition lines. The results draw attention to the fact that basic genetic materials require continuous cytological checks due to their instability. The FISH method applied here has the advantage that it reveals chromosome rearrangements that could not be detected either with the conventional Feulgen staining technique or with molecular markers.

Key words: CS/Imperial addition lines, FISH

Bevezetés

A búza citogenetikai alapanyagok (idegenfajú addíciók, szubsztitúciók, transzlokációk, deléciók, monoszómák, diteloszómák, nulliszómák) értékes források mind a növénynevelés, mind a genetikai és növényélettani alap kutatás számára. Idegenfajú addíciókat számos rokon fajjal, többek között rozssal is létrehoztak a búzában. Segítségükkel vizsgálni lehet az egyes rozs kromoszómáknak a minőségi paraméterekre, biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni ellenállóságra gyakorolt hatását a búza genetikai háttérben, valamint fontos szerepet játszanak a különböző markerek (tartalék fehérjék, izoenzimek, RFLP és RAPD lokuszok) rozskromoszómákon történő térképezésében. Az említett vizsgálatokban gyakran szerepel a világszerte elterjedt, az 1971-ben *Driscoll és Sears* által előállított Chinese Spring/Imperial (CS/Imperial) búza/rozs diszómás addíciós sorozat.

Az evolúció folyamán az egyes fajok, így a hexaploid búza kromoszóma-összetétele is egy adott kariotípusban rögzült. Ha ez az egyensúly felborul (pl. idegen fajú kromoszómák addíciója miatt), akkor a növényekben az eredeti kariotípus visszaállítására irányuló folyamatok indukálódnak. Munkánk célja a génbankokból begyűjtött és fenntartott, genetikai és élettani kutatásokra intézetünkben is használt CS/Imperial addíciós vonalak stabilitásának vizsgálata volt fluoreszcens *in situ* hibridizációval. A különböző repetitív DNS-próbák specifikus hibridizációs mintázatuknak köszönhetően eredményesen alkalmazhatók a molekuláris citogenetikai vizsgálatokban, többek között a kromoszómák, kromoszómakarok azonosítására, de akár az egyes kromoszómakarokon lévő FISH polimorfizmus kimutatására is (*Szakács és Molnár-Láng* 2008).

Anyag és módszer

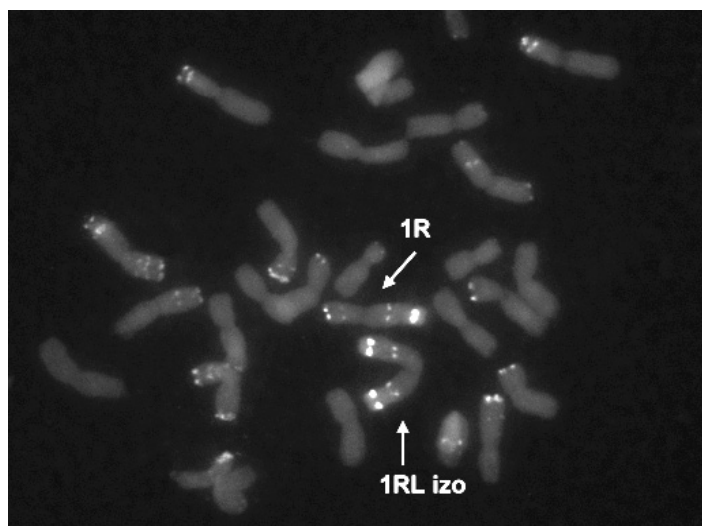
A vizsgálatban hazai (Martonvásár) és külföldi (Kansas State University, Manhattan, Kansas) génbankokból származó CS/Imperial diszómás addíció vonalak szerepeltek. Vonalként 10-10 szemet csíráztattunk ki, az osztódó gyökércsúcsokból metafázisos kromoszóma-preparátumokat készítettünk.

A FISH-t *Linc et al.* (1999) alapján, Fluorogreenel (fluorescein-12-dUTP, Roche) jelölt pSc119.2 repetitív DNS-próba (*Bedbrook et al.* 1980) és Fluororeddel (rhodamine-5-dUTP, Roche) jelölt (AAC)₅ szintetikus oligonukleotid (*Cuadrado et al.* 2000) segítségével végeztük. A próbák jelölése *Vrána et al.* (2000) szerint, polimeráz láncreakcióval (PCR) történt. A tárgylemezenként 30 µl mennyiségű hibridizációs keverék 2 × 30 ng jelölt próbát, 50% formamidot, 20×SSC oldatot, 10% dextránszulfátot, 0,1% SDS-t (sodium dodecyl sulphate) és 1,4 µg blokkoló DNS-t (Salmon sperm) tartalmazott. A hibridizációs keverék felvitele után a preparátumokat 80°C-on denaturáltuk, majd egy éjszakán át 37°C-os hibridizációs kamrában inkubáltuk. A nem teljesen homológ, ezért gyengén kötődő DNS-darabokat 42°C-on végzett 25%-os formamid kezeléssel távolítottuk el. A kontrasztfestés 1 µg/ml DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole, Amersham) történt.

A fluoreszcens jelölődést Zeiss Axioskop-2 epifluoreszcens mikroszkóppal detektáltuk. A fényképeket Spot CCD kamerával (Diagnostic Instruments, Inc., USA) készítettük és az Image ProPlus 4.0 program (Media Cybernetics) segítségével elemeztük.

Eredmények és következtetések

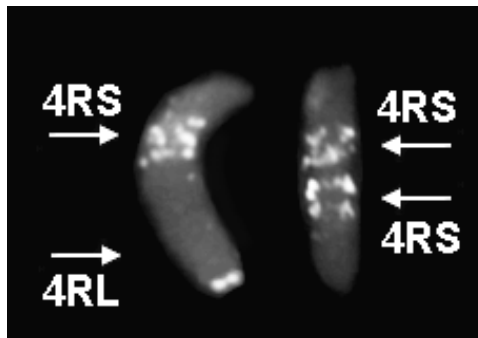
Megfigyeléseink szerint a legnagyobb stabilitással a CS/Imperial 7R addíciós vonal rendelkezett, valamennyi vizsgált növényben kimutatható volt mindkét 7R rozskromoszóma. A CS/Imperial 1R addíciós vonalban a növények 92%-a volt diszómás. Egy növény esetében az egy darab teljes 1R kromoszóma mellett egy izokromoszóma is megfigyelhető volt. A pSc119.2 próba jellegzetes mintázata alapján az izokromoszóma két karját az 1R kromoszóma hosszú karjaként azonosítottuk (*1. ábra*).



1. ábra Egy teljes 1R rozskromoszóma és egy, az 1R kromoszóma hosszú karjából álló izokromoszóma a CS/Imperial 1R diszómás addíciós vonal egyik utódnövényében. A pSc119.2 repetitív DNS-próba 1RL karra specifikus hibridázációs mintázata alapján az izokromoszóma egyértelműen azonosítható.

A CS/Imperial 6R addíciós vonal utódnövényeiben a diszómás állapot már csak 85%-ban maradt meg, a növények 15%-a monoszómás volt. Az CS/Imperial 5R addíciós vonalban ez az arány tovább romlott, 40% volt a diszómás és 60% a monoszómás növények aránya. A CS/Imperial 3R addíciós vonal esetében az utódok 47%-ból teljesen eliminálódott a rozs kromoszóma. A növények 20%-a diszómás, 27%-a monoszómás, 6%-a pedig teloszómás állapotban volt. A CS/Imperial 2R addícióból az idegen kromoszóma ugyan csak 17%-ban vészett el, a növények maradék 83%-ában azonban kizárólag

telocentrikus kromoszómákat sikerült azonosítanunk. Vizsgálatunkban legrosszabbul a CS/Imperial 4R addíciós vonal szerepelt. A növények 10-10%-ában vagy csak egy darab 4R vagy két darab 4RS telocentrikus rozskromoszóma volt jelen, 70%-ában az idegen kromoszóma nem volt kimutatható. Szintén 10%-ában izokromoszómát is találtunk. Az (AAC)₅ szintetikus oligonukleotid 4R kromoszómára specifikus hibridizációs jeleinek segítségével megállapítottuk, hogy az izokromoszóma két rövid karból áll (2. ábra).



2. ábra A 4RS izokromoszóma kimutatása (AAC)₅ szintetikus oligonukleotid próbával. Jól látható, hogy a jobboldali kromoszóma mindkét karjának FISH mintázata megegyezik a baloldalon feltüntetett 4R kromoszóma rövid karjának mintázatával.

A bemutatott adatok megerősítik azokat a megfigyeléseket, melyek szerint az idegen kromoszómák eltérő gyakorisággal eliminálódnak a búzagenomból (Taketa *et al.* 1995, Molnár-Láng *et al.* 2005). Ennek pontos oka jelenleg még nem ismert. A 2R rozskromoszóma nagymértékű instabilitását búza genetikai háttérben már korábban leírták oktoploid tritikálén végzett vizsgálatokban (Cheng and Murata 2002). A 2R kromoszómának az a jellegzetessége, hogy az általunk vizsgált növényekben kizárólag különálló karokként (telocentrikus kromoszómák) volt jelen, jól korrelál azzal a megfigyeléssel, hogy a transzlokációkban ez a rozskromoszóma fordul elő a leggyakrabban (Lukaszewski and Gustafson 1983).

Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a génbankokból beszerzett, felszaporított és évekig fenntartott genetikai alapanyagok instabilitásuk miatt folyamatos citológiai kontrollra szorulnak. Fajidegen kromoszómát hordozó tételek ugyan rendelkezhetnek olyan jellegzetes morfológiai bélyegekkel, melyek alapján megállapítható az idegen kromoszóma jelenléte, azonban a pontos kromoszóma-összetételre nem következtethetünk. A modern molekuláris citogenetikai eljárások lehetőséget adnak rendkívül kifinomult vizsgálatok elvégzésére is. Az ellenőrzésre használt FISH módszer előnye, hogy segítségével olyan kromoszóma-átrendeződések is láthatóvá válnak (pl. az izokromoszómák), melyek nem mutathatók ki sem a hagyományos Feulgen festési eljárással, sem molekuláris markerekkel.

Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatokat a K 75381 számú OTKA, és az AGRISAFE 203288 sz. EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázat támogatta.

Irodalom

- Bedbrook, J. R., Jones, J., O'Dell, M., Thompson, R.J., Flavell, R.B. (1980): A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell*, **19**, 545-560.
- Cheng, Z.J., Murata, M. (2002): Loss of chromosomes 2R and 5RS in octoploid triticale selected for agronomic traits. *Genes Gen. Syst.*, **77**, 23-29.
- Cuadrado, A., Schwarzacher, T., Jouve, N. (2000): Identification of different chromatin classes in wheat using *in situ* hybridization with simple sequence repeat oligonucleotides. *Theor. Appl. Genet.*, **101**, 711-717.
- Driscoll, C., Sears, E.R. (1971): Individual addition of the chromosomes of "Imperial" rye to wheat. *Agron Abst.*, **6**.
- Linc G., Friebe B.R., Kynast, R.G., Molnár-Láng, M., Kőszegi, B., Sutka, J., Gill, B.S. (1999): Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* host. *Genome*, **42**, 497-503.
- Lukaszewski, A.J., Gustafson, J.P. (1983): Translocations and modifications of chromosomes in triticale × wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, **64**, 239-248.
- Molnár-Láng, M., Novotny, C., Linc, G., D. Nagy, 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**, 247-252.
- Szakács, É., Molnár-Láng, M. (2008): Fluorescent *in situ* hybridization polymorphism on the 1RS chromosome arms of cultivated *Secale cereale* species. *Cereal Res. Commun.*, **36**, 247–255.
- Taketa, S., Kato, J., Takeda K. (1995): High crossability of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with bread wheat and the differential elimination of barley chromosomes in the hybrids. *Theor. Appl. Genet.*, **91**, 1203-1209.
- Vrána, J., Kubaláková, M., Simková, H., Čihalíková, J., Lysák, M.A., and Dolezel, J. 2000. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, **156**: 2033-2041.