

DI-, TETRA- ÉS HEXAPLOID TRITICUM FAJOK GENOMJAINAK ELEMZÉSE ÉS AZOK ÖSSZEHASONLÍTÁSA FLUORESZCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓVAL

VARGA MÓNIKA, MOLNÁR ISTVÁN ÉS KOVÁCS GÉZA

MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

A *T. monococcum* hasznos agronómiai tulajdonságainak természetett búzába történő beépítése céljából a *T. turgidum ssp. durum* (A^uA^uBB , $2n=4x=28$) x *T. monococcum ssp. monococcum vulgare* keresztezésével szintetikus hexaploidokat ($A^uA^uBBA^mA^m$, $2n=6x=42$) állítottunk elő. A kromoszómaátrendeződések követése céljából szükséges az A^u és A^m genomok megkülönböztetése egymástól, mely probléma megoldására fluoreszcens *in situ* hibridizációt végeztünk repetitív DNS próbák (Afa family, pSc119.2, pTa71) segítségével *T. monococcum*-on, *T. turgidum ssp. durum*-on és *T. aestivum*-on. Eredményeink azt mutatják, hogy a pSc119.2 próba nem alkalmas a különböző eredetű 'A' kromoszómák elkülönítésére, az ugyanis nem adott hibridizációs jelet a *T. monococcum* kromoszómáin, míg a pTa71 és az Afa family próbák hibridizációs mintázata alapján az 1-es, 4-es és 5-ös homeológ csoportok egymástól egyértelműen elkülöníthetők. A többi homeológ csoporton belüli megkülönböztethetőség érdekében, a jövőben további repetitív próbák alkalmazását tervezzük.

Kulcsszavak: *T. monococcum*, *T. turgidum ssp. durum*, *T. aestivum*, A genom, FISH

GENOME ANALYSIS OF DI-, TETRA- AND HEXAPLOID TRITICUM SPECIES AND THEIR COMPARISON BY FLUORESCENT *IN SITU* HYBRIDIZATION

M. VARGA, I. MOLNÁR AND G. KOVÁCS

Agricultural Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Martonvásár

T. turgidum ssp. durum (A^uA^uBB , $2n=4x=28$) x *T. monococcum ssp. monococcum vulgare* synthetic hexaploids were developed in order to transfer favourable agronomic traits from *T. monococcum* into cultivated wheat. The differentiation of the A^u and A^m chromosomes is essential for the identification of homeologous recombinations between them. Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) was carried out with repetitive DNA probes (Afa family, pSc119.2, pTa71) on the somatic chromosomes of *T. monococcum*, *T. turgidum ssp. durum* and *T. aestivum*. The results show that the pSc119.2 probe is not suitable for the discrimination of different A chromosomes because it does not produce hybridization signals on *T. monococcum* chromosomes. In contrast, the A^m and A^u chromosomes within the homologous groups 1, 4 and 5 could be clearly differentiated from the hybridization patterns of the pTa71 and Afa family probes. Further repetitive DNA probes will be needed for the discrimination of A chromosomes within the homologous groups 2, 3, 6 and 7.

Key words: *T. monococcum*, *T. turgidum ssp. durum*, *T. aestivum*, A genome, FISH

Bevezetés

Az alakor (*Triticum monococcum*) az egyik legősibb, a *T. aestivum*-mal igen közeli rokonságban levő, természetett gabonánk, mely 7 pár kromoszómát ($A^m A^m$, $2n=2x=14$) tartalmaz. Számos értékes agronómiai tulajdonsággal rendelkezik, melyek közül kiemelhető fagyállósága, gombabetegségekkel szembeni ellenállósága, nagy szárszilárdsága és gyomelnyomó képessége. Igénytelen gabonafajta, vegyszermentes körülmények között is természetű. Lizin-, mikroelem- és essenciális aminosav-tartalma igen magas, szénhidrát-tartalma alacsony, az élettani szempontból rendkívül fontos tokol- és karotinoid tartalma kiemelkedő. Utóbbi tulajdonsága miatt egészségvédő élelmiszerek előállítására is alkalmas lehet. A nemesítés számára nagy jelentőséggel bírhat olyan genotípusok létrehozása, melyek révén az alakor hasznos tulajdonságait hordozó kromoszóma szegmentumok átvihetők a búza genomjába.

Ennek érdekében a *T. monococcum* és *T. turgidum ssp. durum* (AABB, $2n=4x=28$) keresztezésével szintetikus hexaploid genotípusokat ($A^m A^m BBAA$, $2n=6x=42$) állítottunk elő, melynek utódnemzedékeiben homeológ rekombináció fellépését várjuk. A szintetikus hexaploid vonalak genom analíziséhez szükséges a *T. monococcum* A^m genomjának megkülönböztetése a durum búzában található *T. urartu* eredetű A genomtól. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) kiválóan alkalmas az egyes repetitív DNS szekvenciák egyes fajok kromoszómáin elfoglalt pozíciójának megállapítására. A jelölt repetitív szekvenciákat próbaként alkalmazva a FISH során a kapott hibridizációs mintázat alapján az egyes kromoszómák megkülönböztethetők egymástól (Molnár et al. 2009).

Az A^u és A^m genom megkülönböztetése céljából magas kópiaszámú repetitív DNS szekvenciákkal (Afa family, pTa71 és pSc119) fluoreszcens *in situ* hibridizációt (FISH) végeztünk a *T. monococcum*, *T. turgidum ssp. durum* és *T. aestivum*) fajok szomatikus kromoszóma preparátumain. A citológiai elemzés során a kapott mintázat alapján azonosítottuk az egyes különböző eredetű A kromoszómákat, majd elkészítettük a három faj A genomjának kariotípusát.

Anyag és módszer

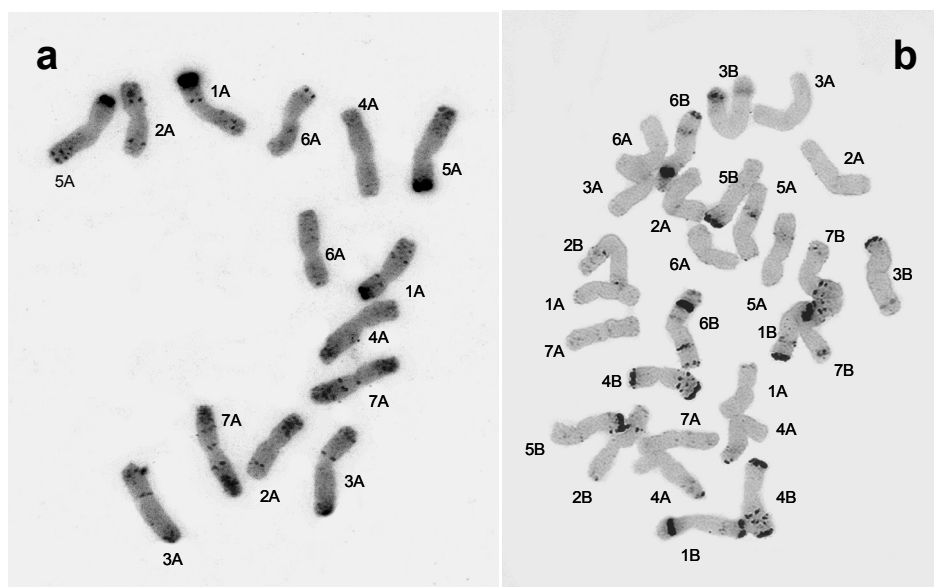
Vizsgálatainkhoz a *T. monococcum ssp. monococcum vulgare* MvGB089, *T. turgidum ssp. durum* és *T. aestivum* cv. Chinese Spring genotípusokat használtuk. A kísérleti növények gyökércsúcsából mitotikus kromoszóma preparátumokat készítettünk a Schneider et al. (2003) által leírt módszer szerint.

A FISH során a következő repetitív DNS próbákat alkalmaztuk: az *Ae. tauschii*-ből izolált Afa family (Nagaki et al. 1995), a rozsól származó pSc119.2 (Bedbrook et al. 1980), valamint a 18S-5.8S-26S riboszómális DNS szekvenciákat tartalmazó pTa71 klónt (Gerlach and Bedbrook 1979). A pSc119.2 próbát biotinnal, az Afa-family próbát digoxigeninnel a pTa71 próbát 50-50% biotinnal és digoxigeninnel jelöltük. A mitotikus kromoszómapreparátumok előkezelései, a hibridizáció és az azt követő mosási lépések a Molnár et al. (2009) által leírt módon történtek. A digoxigeninnel illetve biotinnal jelölt repetitív DNS próbák hibridizációs jeleit anti-digoxigenin-Rhodamin és streptavidin-FITC alkalmazásával tettük láthatóvá vörös ill. zöld színekkel. A repetitív próbák hibridizációs jelének rögzítése Zeiss Axioskop-2 fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakoztatott Spot CCD kamerával történt. A fotók kiértékelése Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) software alkalmazásával történt.

Eredmények és következtetések

Az FISH eredményeként a *T. monococcum* kromoszómáin egyértelmű hibridizációs mintázat volt megfigyelhető az Afa family próbával (1a ábra). A hibridizációs sávok többsége a kromoszóma karok végén interkaláris vagy disztális pozícióban volt megfigyelhető. A legkomplexebb mintázat a 7A^m kromoszómán, a legkevesebb sáv a 6A^m kromoszómán volt detektálható. A 18S-5.8S-26S rDNS szekvenciákat tartalmazó pTa71 próba intenzív fluoreszcens jelet mutatott az 1A^m és 5A^m kromoszómák rövid karjának telomér régiójában. Hibridizációs sávok kialakulása a pSc119.2 próbával nem volt megfigyelhető.

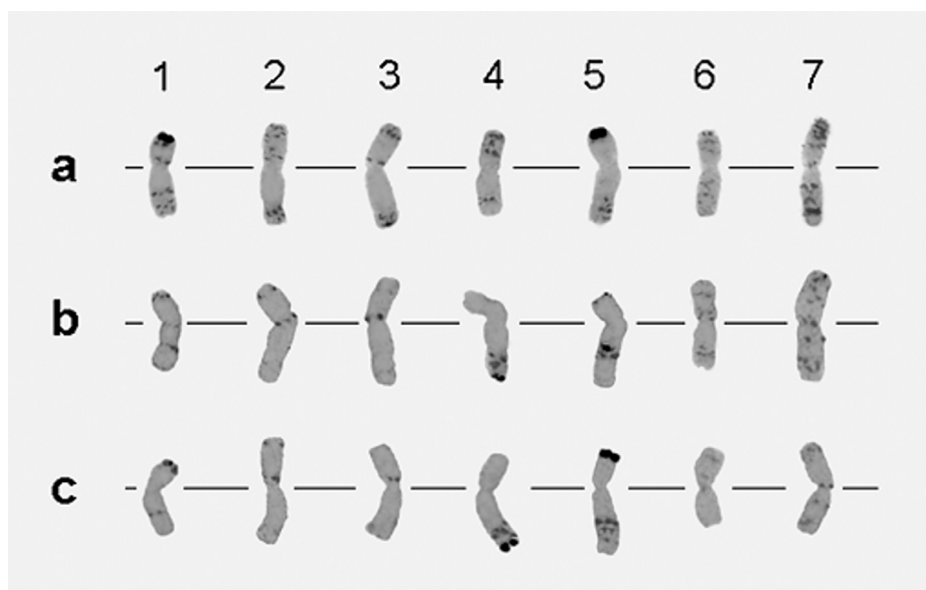
A *T. turgidum ssp. durum* szomatikus kromoszómáin mindhárom repetitív DNS próba egyértelmű hibridizációs mintázatot mutatott (1b ábra). Az Afa family próba sávjai nagyrészt az A genom kromoszómáin, míg a pSc119.2 próba a B kromoszómákon volt lokalizálható. A pTa71 riboszómális DNS próba erős hibridizációs jelet mutatott az 1B és 6B kromoszómák Nor régiójában valamint gyenge, csak időnként megjelenő szignált az 1AS kromoszómakar telomér régiójában. A kapott hibridizációs mintázatok alapján a durum búza minden



1. ábra A *T. monococcum* (a) és a *T. turgidum ssp. durum* (b) szomatikus kromoszómái a fluoreszcens *in situ* hibridizáció után. A FISH képeken a pTa71 próbákat sötétebb, míg az Afa family próbákat világosabb hibridizációs sávok jelölik. Skála: 10 μ m.

kromoszómája azonosítható volt. Az említett repetitív DNS próbákkal (pSc119.2, Afa family, pTa71) végzett FISH eredményeként a *T. aestivum* (cv. Chinese Spring) kromoszómáit is azonosítottuk. A három fajon végzett hibridizációs kísérletek eredményeként elkészítettük a *T. monococcum* A^m valamint a *T. turgidum ssp. durum* és a *T. aestivum* A genomjának kariotípusát

(2. ábra). Ismeretes, hogy a *T. turgidum* és a *T. aestivum* A genomjának diploid őse a *T. urartu* volt. A *T. monococcum* A^m és az allotetraploid valamint allohexaploid búzák Aⁿ genomjai között számos hasonlóság fedezhető fel, mely megnyilvánul az alkalmazott próbák hibridizációs mintázatában is. A legnagyobb hasonlóság a 3-as, 6-os és 7-es homeológ csoport tagjai közt volt megfigyelhető. A három faj kariotípusát összehasonlítva csak kismértékű különbséget figyeltünk meg a *T. turgidum* és a *T. aestivum* között. A két kariotípus közti hasonlóság összefüggésben áll azzal, hogy az evolúció során a *T. aestivum* a *T. turgidum* és az *Ae. tauschii* természetes hibridizációjának eredményeként jött létre. Valószínűleg a poliploidizációval magyarázható az is, hogy az egyes kromoszómák hibridizációs mintázata a *T. monococcum*-ban mutatta a legnagyobb komplexitást. Az alakorhoz képest a durum és kenyérbúza A kromoszómáin a hibridizációs sávok számának fokozatos csökkenését tapasztaltuk. Jó példa erre az 1A^m és 5A^m rövid karján megfigyelhető erős pTa71 szignál eltűnése a poliploid búzában. Hasonló tendencia figyelhető meg az egyes karok (pl. 1, 2, 3 7 homeológ csoportok) disztális és szubterminális régiójában található Afa family sávok esetében is.



2. ábra A *T. monococcum* (a), a *T. turgidum* ssp. *durum* (b) és a *T. aestivum* (c) A genomjának kariotípusa az Afa family, pSc119.2 és pTa71 próbák hibridizációs mintázata alapján. A pSc119.2 és pTa71 próbák hibridizációs jeleit sötétebb, míg az Afa family próbáét világosabb sávok jelölik.

Hasonló megfigyelésekről számoltak be a pGc1R-1 repetitív szekvenciával kapcsolatban is, melyek jelen vannak a hexaploid búza B és G genommal rendelkező diploi őseiben, de hiányoznak a tetra és hexaploid búzában (Han et al. 2005). A repetitív DNS szekvenciák eliminálódása összefüggésben állhat az allopoliploid faképződéssel. Ennek során a nagyon

különböző genomok a magas kópia számú repetitív szekvenciák elvesztésével igyekeznek a genomi inkompatibilitást megszüntetni, mely hozzájárulhat a diploid-szerű meiózis jelleg és ezen keresztül a stabil öröklődés kialakulásához. (Han *et al.* 2005).

Eredeti célunk volt, hogy repetitív DNS próbák hibridizációs mintázata alapján próbáljunk meg olyan karakterisztikus sávokat találni, melyek révén a *T. monococcum* x *T. turgidum* ssp. *durum* keresztezésekkel létrehozott szintetikus hexaploidokban meg tudjuk különböztetni az A^m és A^u genomok kromoszómáit. A pTa71 és az Afa family próba hibridizációs mintázata alapján az 1-es, 4-es és 5-ös homeológ csoport esetében lehetséges a különböző eredetű A kromoszómák megkülönböztetése. A többi homeológ csoport elkülönítése érdekében a jövőben szükséges további repetitív próbák alkalmazása is.

Köszönetnyilvánítás

A dolgozat a GAK Alakor_5, a K 67808 sz. OTKA és az AGRISAFE 203288, EU-FP7-REGPOT 2007-1 pályázatok támogatásával készült.

Irodalom

- Bedbrook, J., Jones, J., O'Dell, M., Thompson, R.D., Flavell, R.B. (1980): A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* **19**: 545–560.
- Han, F., Fedak, G., Guo, W. and Liu, B. (2005): Rapid and Repeatable Elimination of a Parental Genome-Specific DNA Repeat (pGc1R-1a) in Newly Synthesized Wheat Allopolyploids. *Genetics* **170**: 1239–1245.
- Gerlach, W.L., Bedbrook, J.R. (1979): Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1869–1885.
- 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.
- 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.
- Schneider, A., Linc, G., Molnár-Láng, M. (2003): Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breeding*, **122**: 396-400.