

OTKA K67808 zárójelentés 2012.

A termesztett búza diploid őseinek molekuláris citogenetikai elemzése: pachytén- és fiber-FISH.

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) olyan technikai fejlettséget ért el napjainkra, hogy egyes alternatív módjainak alkalmazása lehetőséget teremt különböző molekuláris markerek fizikai térképezésére az adott kromoszómákon. A modern növénynevelés számára elengedhetetlen fontosságú a FISH módszer felhasználása, mivel az intenzív nevelés hatékony ellenőrző rendszert kíván. Az egyes nevelési és genetikai alapanyagokban a beépült DNS szegmentumok és gének precíz, gyors és megbízható nyomon követése kívánatos. Erre kiválóan alkalmas molekuláris citogenetikai módszerek a pachytén- és a fiber-FISH. A pachytén-FISH a kromoszómák kedvező morfológiai tulajdonságait használja ki. A pachytén szakaszban (meiosis I. profázisának harmadik alfázisa) lévő kromoszómák kevésbé kondenzáltak (egyes fajoknál, pl. rizs ~40-szer hosszabbak), de ISH után még biztonsággal megkülönböztethetők és azonosíthatók. A fiber-FISH technika csupasz DNS szálakat használ a preparátumokon. A módszer előnye, hogy a legjobb felbontással és a legrövidebb kimutatható tartománnyal rendelkezik (~1-5Kb), hátránya azonban, hogy nincs kromoszóma szerkezet, így az adott DNS szakasz azonosítása és pozíciójának meghatározása csak ismert kontroll DNS szakasz mellett lehetséges.

Pályázatunk során legfontosabb célunk volt a pachytén-FISH technika adaptálása a martonvásári Génmegőrzés és Organikus Nevelés Osztály Molekuláris Citogenetika Laboratóriumában. Munkánk során elsőként a termesztett búza (*Triticum aestivum* L. AABBDD, $2n=6x=42$) diploid donor genomjainak (AA genommal rendelkező fajok közül a *Triticum urartu* és *Triticum monococcum* 1-1 genotípus, a BB genommal legnagyobb homológiát mutató SS genomot hordozó fajok közül az *Aegilops bicornis* és *Aegilops speltoides* 2-2 genotípus, valamint a DD genomot hordozó *Aegilops tauschii* 5 genotípus) tenyészkerti felszaporítását végeztük el.

A pachytén preparátumok készítése a mitotikus preparátumok készítési módjától eltér. Ennél a technikánál portokokból állítottuk elő az *in situ* hibridizációra alkalmas tárgylemezeket, amelyeket előzőleg abszolút alkohol és jéget 3:1 arányú keverékben fixáltunk. A pachytén fázisban lévő osztódó sejteket tartalmazó portokok kiválogatása szinte fajonként változik és gyakorlatot igényel. Különböző időpontokban begyűjtött kalászok eltérő magasságban

elhelyezkedő kalászkáinak portokaiból préselt preparátumot készítettünk, majd szelektáltuk a meiózis I. pachytén fázisában lévő osztódó sejteket. A kalász közepén elhelyezkedő kalászkákban található a legelőrehaladottabb meiotikus fázis. Megállapítottuk, hogy a délelőtti órák a legoptimálisabbak a kalászok begyűjtésére, hiszen az így begyűjtött növényekben található a legtöbb sejt a számunkra megfelelő fázisban.

Teszteltük a különböző kalász-fixálási módszereket. Azt vizsgáltuk, hogy melyik a legalkalmasabb a diploid *Aegilops* fajok kalászainak fixálására, valamint mely fixálási technika alkalmazását követően tudunk megfelelő minőségű preparátumot készíteni az *in situ* hibridizációs kísérletekhez. A Carnoy I. (abszolút etanol: jégcet 3:1 arányú keveréke) és Carnoy II. (abszolút etanol: kloroform: jégcet 6:3:1 arányú keveréke) fixálási módot összehasonlítva megállapítottuk, hogy a Carnoy II. fixáló hatására érzékenyebbé, sérülékenyebbé válik a kromatin struktúrája.

A fixálást követően a pollenanyasejtek falát 3 enzim 1%-os oldatának - celluláz, pektoláz, citohelikáz - 1:1:1 arányú keverékével emésztettük, 37°C-on. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a különböző genotípusok eltérő időtartamú enzimátikus emésztést igényelnek (pl. *T. urartu* 3 óra, *Ae. speltoides* 4 óra). A hosszabb ideig -20°C-on tárolt enzimkeverék fokozatosan veszített aktivitásából.

A tárgylemezek minőségét DAPI-val történt festést követően ellenőriztük (Fig 1a). A kísérletekhez szükséges megfelelő minőségű preparátumokról különböző pufferekben történt mosással eltávolítottuk a DAPI-t és száradás után a tárgylemezeket -20°C-on tároltuk.

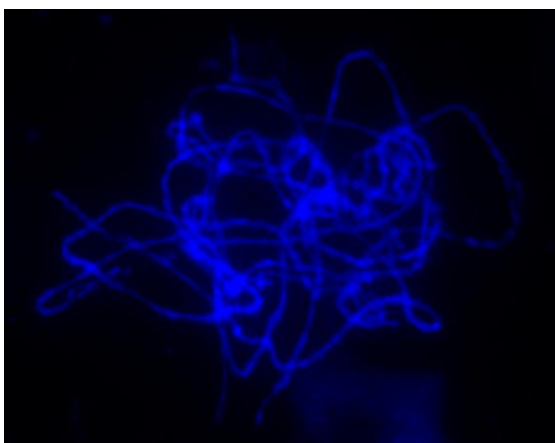


Fig 1.a

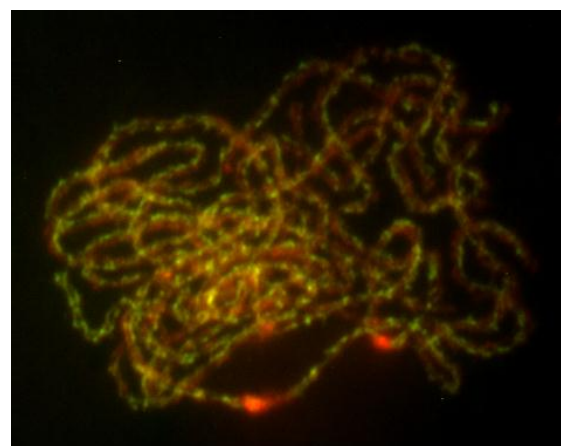


Fig 1.b

A meiosis I. profázis pachytén fázisában a kromoszómák párosodottak és dekondenzáltak és kiválóan alkalmasak különböző DNS szekvenciák térképezésére. Kísérleteinkhez egy *Lolium*×*Festuca* mesterséges hibrid kromoszóma készletét használtuk fel. Genomikus *in situ* hibridizáció segítségével a két genom kromoszómái elkülöníthetők és nagy biztonsággal meghatározható a meiotikus profázis pachytén szakasza (Fig 1b). Jól megfigyelhető a két faj teljesen párosodott kromoszóma készlete (*Lolium* zöld, *Festuca* piros).

Előkísérleteink során az *Arabidopsis* genomból izolált teloméra specifikus klónt (HT 100.3) alkalmaztuk különböző repetitív DNS szekvenciákkal együtt (pl. 45S rDNA- pTa71) az *Aegilops tauschii* (DD genom) és a *Triticum monococcum* (AA genom) diploid fajok kromoszómáin, meiotikus profázisban lévő sejteken. A HT100.3 DNS klón a *Triticeae* nemzetségben és virágzó növényekben általánosan jelen levő CCCTAAA szakaszt hordozza. A felvételen megfigyelhető az egyes kromoszómák telomérájához hibridizált HT100.3 próba (Fig 2, piros hibridizációs jel).

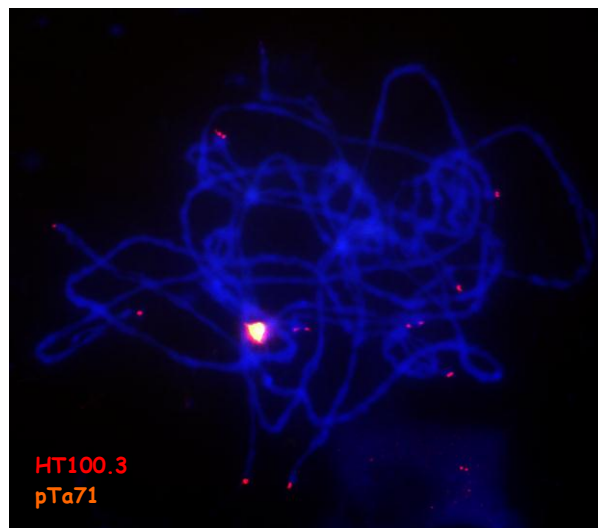


Fig 2.

A hexaploid búza genomjából izolált, egyedi szekvenciákat térképeztünk az *Ae. tauschii* (DD) és a *T. monococcum* (AA) genomok pachytén kromoszómáin.

Számos, a búza genom DNS-en PCR-el felszaporított trinukleotid szekvencia közül az ACG trinukleotid szekvencia egyedi jelet mutatott a hexaploid búza 4D kromoszómáján. A szekvenciát az *Ae. tauschii* genom pachytén kromoszómáján térképeztük. Referencia DNS próbaként a HT100.3 (teloméra specifikus) és a ZCF1 (centroméra specifikus) klónokat használtuk fel (Fig 3, ACG piros nyíl, HT100.3 és ZCF1 próbák zöld hibridizációs jel)).

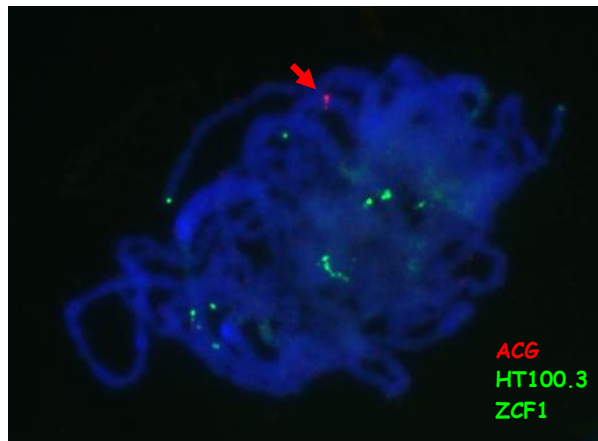


Fig 3.

A ZCF1 a hexaploid genom DNS-en felszaporított, PCR alapú marker. Tesztelés után megállapítottuk, hogy az *Aegilops bicornis* (SS), *Triticum monococcum*(AA) és *Triticum urartu* (AA) genomok kromoszómáin is megtalálható ez a szekvencia.

Az *Ae. tauschii* (DD) és a *T. monococcum* (AA) pachytén fázisban lévő kromoszómáin teszteltük a Dx5 HMW gént. A teljes konstrukció (pHMW1Dx5) repetitív DNS szakaszokat tartalmaz. Korábbi pályázatunk keretében sikerült olyan próbákat előállítani, amely egyre kevesebb repetitív DNS szakaszt tartalmazott.

A Dx5 gén egyedi jelölődést mutatott mind az *Ae. tauschii*, mind a *T. monococcum* genomban. Az AA genomban nagy valószínűséggel a Dx5 gén „A” homológja mutatott egyedi hibridizációs jelet (Fig 4, Dx5 piros nyíl).

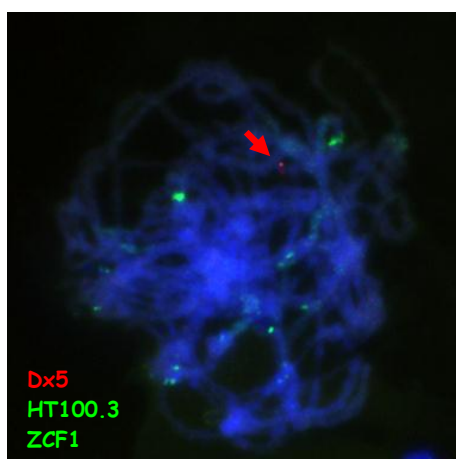


Fig 4.

A hexaploid búza genomból nem állt rendelkezésünkre megfelelő számú és minőségű BAC DNS klón. A szekvenciák nagy számú repetitív szakaszokat hordoztak, amely lehetetlenné

tette számunkra a klónok térképezését a diploid genomok pachytén kromoszómáin. Ezért kísérleteinkhez a pályázat utolsó éveiben a *Brachypodium distachyon* genomból származó DNS plazmidokat használtuk fel. Ez a faj a szálkaperje, amely a *Triticeae* nemzetségbe tartozik és a termesztett búza modell növénye, 2010-ben vált ismertté a teljes genom szekvenciája (The IBI, International Brachypodium Initiative).

A *B. distachyon* genomból származó BAC klónok begyűjtése, izolálása és felhasználásuk pachytén-FISH kísérletekhez a Dr Robert Hasterok professzorral (Sziléziai Tudományegyetem, Katowice, Lengyelország) kialakított együttműködés keretében történt. Laboratóriumukban nagy számú *Brachypodium* BAC DNS szekvenciát tartalmazó könyvtárat tartanak fenn. Martonvásáron jelenleg 13 klónnal rendelkezünk a faj mind az öt kromoszómájára: 15-G12, 26-H1, 41-A8, 63E3, 42H8, 33F12, 54D7, 33F2, 32C1, 63E9, 58H2, 3H4, 63E4. A BAC klónok között szerepelnek egyedi, low-copy szekvenciák, ill. pericentroméra körüli, ismétlődő szekvenciát hordozó plazmidok is. A FISH kísérletekben kontroll DNS-ként rDNS vagy egyéb ismétlődő szekvenciát hordozó DNS próbát alkalmaztunk. Eredményeinkről elmondható, hogy egyedi szekvenciát nem sikerült azonosítani az *Ae. tauschii* és a *T. monococcum* pachytén kromoszómákon. Kísérleteinket tovább folytatjuk, új DNS klónok begyűjtése és próbák előállítása folyamatban van.

Irodalomjegyzék

The IBI, International Brachypodium Initiative 2010, Nature, Vol. 463/11