

## Szakmai zárójelentés

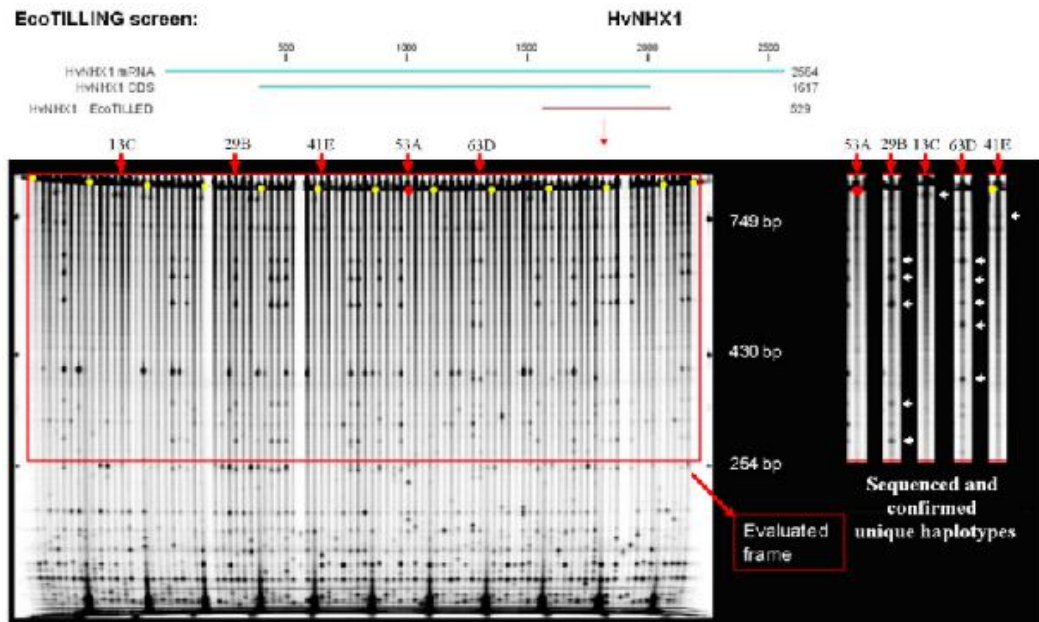
### ***'Kései szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltek asszociációs vizsgálata árpaiban EcoTILLING módszerrel' című OTKA pályázat (OTKA azonosító: 72366)***

Kutatásaink elsődleges célja a szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó gének természetes variabilitásának vizsgálata volt az EcoTILLING (Eco-Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) módszer meghonosítása és optimalizálása útján, amelyet árpa genotípusok allélvariánsainak elkülönítésére valamint molekuláris markerek kifejlesztésére használtunk.

Az EcoTILLING vizsgálatokhoz szárazságtűrés szempontjából nagy genetikai variabilitást mutató, 96 genotípust tartalmazó árpa kollekción állítottunk össze, amelyben a szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek génvariánsainak/haplotípusainak elkülönítését végeztük az EcoTILLING módszerrel. A szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek kiválasztása során elsősorban irodalmi adatokra támaszkodtunk. Emellett lényeges volt, hogy a vizsgálandó lókusztól rendelkezésre álljon szekvencia információ, hiszen csak ez alapján tervezhetők megfelelő primerek. A kandidátus géneket expressziós mintázatok, quantitative trait locus (QTL) térképezési eredmények illetve élettani funkciójuk alapján választottuk ki. Elsősorban az abiotikus stresszválaszban szereplő géneket tanulmányoztuk. Vizsgálatba vontunk ezen kívül olyan nagyhatású géneket is, melyek a szárazságtolerancia szempontjából is pleotróp hatással rendelkezhetnek.

A kiválasztott génekre a génszakaszok felszaporítására alkalmas primerpárokat terveztünk. Összesen 18 amplikon EcoTILLING vizsgálatát végeztük el a teljes 96 genotípust tartalmazó árpa populációban. Az amplikonok enzimes hasítása és szekvenáló készüléken történő futtatása után a kapott mintázatokat kiértékeljük. Az azonos hasított fragmentumokat tartalmazó mintákat haplotípus kategóriákba soroltuk. Az azonosított haplotípusokat pedig két irányból megszekvenáltuk. A reverse és forward szekvenciák összeillesztése valamint az így kapott haplotípus szekvenciák többszörös illesztésével meghatároztuk az adott amplikonban előforduló polimorfizmusokat. Az 1. ábra a

HvNHX (Hordeum vulgare mRNA for sodium/proton antiporter) gén vizsgált ampliconjának EcoTILLING mintázatát mutatja be.



1. ábra: HvNHX (Hordeum vulgare mRNA for sodium/proton antiporter) gén ampliconjának EcoTILLING analízise. A Cel-1 es hasítás eredményeként kapott hasított fragmentumokat a fehér nyilak jelölik. A kapott mintázat alapján a 92 genotípust 5 haplotípus kategóriába sorolható.

Vizsgálataink eredményeként az EcoTILLING módszerrel vizsgált 1.5 millió bázispárnyi szekvencia vált ismertté, a vizsgált 9 génben összesen 94 haplotípust (allélvariáns) különítettünk el, 185 SNP-t (Single-Nucleotide Polymorphism) és 46 INDEL-t (Inszerció/Deléción) azonosítottunk.

Összesen 4 génre – Hordeum vulgare AR-h gene for aldose reductase (HvARH1), Hordeum vulgare HVA1 gene (HvA1), Hordeum vulgare HvSRG6 gene for stress responsive gene protein 6 (HvSRG6), Hordeum vulgare AP2 transcriptional activator gene (HvDRF1) - könnyen detektálható, elsősorban fragment hosszúság eltérése alapján genetikai markereket fejlesztettünk ki. Az említett gének allélikus variabilitását a teljes génszakasz mentén (a promotor régiót is beleértve) feltártuk az EcoTILLING eljárással.

A haplotípus-szekvenciák és polimorfizmusok birtokában olyan marker-kombinációkat konvertáltunk genetikai markerekké, amelyek alkalmasak a populációban előforduló leggyakoribb haplotípusok detektálására illetve elkülönítésére. A marker-

kombinációk kiválasztásánál ügyeltünk arra, hogy a markerek azokat a haplotípusokat is el tudják különíteni, amelyek aminosav szinten is különbséget mutattak. A kifejlesztett markerekkel a teljes árpa populáció regenotipizálását elvégeztük.

A HvARH1 gén teljes szekvenciájára 4 amplikont terveztünk, amelyeket EcoTILLING vizsgálatba vontunk. Az amplikonokra kapott haplotípusok szekvenciáiban összesen 77 polimorfizmust (56 SNP-t és 21 INDEL-t) azonosítottunk. Hét polimorfizmusra tervezett markerek segítségével a 95 tagot számláló árpa populációt regenotipizáltuk. Ezen a markereknek a segítségével az összes lehetséges HvARH1 haplotípus elkülöníthető. Az SRG6 gén esetében például a gén teljes hosszában azonosított 56 polimorfizmus (49 SNP és 5 Indel) közül 3 Indel detektálására 2 SSLP markert alkalmaztunk. A HvDRF1 génre 3, a HvA1 génre pedig szintén 2 markert fejlesztettünk ki. Ezek a potenciálisan „génen belüli” markerek közvetlenül felhasználhatók az árpa szárazságtűrés QTL térképezése során valamint a markerre alapozott szelekcióban.

További amplikonok vizsgálata helyett egy újszerű megközelítést alkalmaztunk, amelynek alkalmazásával a vizsgálandó populációk mérete lényegesen csökkenthető, azaz költségek, idő és munkaráfordítás takarítható meg. Segítségével a meglévő adatok alapján egy algoritmus használatával modellezhető a genetikai variabilitás mértéke az általunk vizsgált populációban és az abból kialakított/kialakítható szubpopulációkban.

Ennek érdekében a projekt keretén belül felépítettünk egy interneten keresztül hozzáférhető adatbázist. A „BAHADAS – BARley HApIotype DAtaSe for drought-related candidate genes” névre keresztelt adatbázis tartalmazza a projekt keretén belül megvalósult összes eredményt, amelyet a <http://bhd.szbk.u-szeged.hu/haplotipusok/index.php> weboldalon lehet elérni. A weboldal jelszóval védett (username: totto, password: pwd1). Az integrált „keresési funkciókkal” ellátott adatbázis az általunk generált adatokra épül, könnyen áttekinthető, kezelhető formában jeleníti meg azokat. Az általunk használt újszerű megközelítés lényege, hogy a rendelkezésünkre álló allélvariabilitási adatok felhasználásával modellezni lehet a genetikai variabilitás mértékét az általunk vizsgált populációban és az abból kialakított/kialakítható szubpopulációkban. Az úgynevezett „core collection” szubpopulációkat a teljes populációból kiválasztott egyedek, genotípusok alkotják, amelyek a teljes populációt

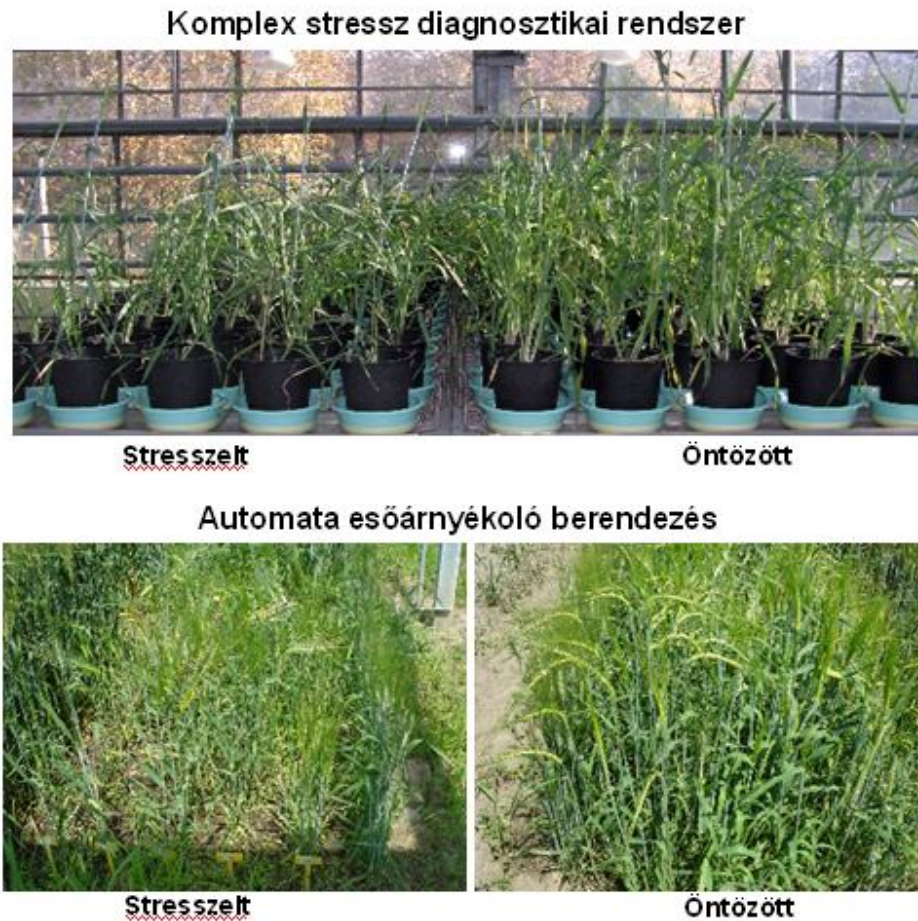
megközelítő genetikai variabilitással rendelkeznek. Az ilyen módon összeállított szubpopulációk minden esetben nagyobb variabilitást mutatnak, mint a véletlenszerűen kiválasztottak. A projekt keretein belül bevezetett „core collection” algoritmus új innovatív projektek kiindulópontja lehet, amelyben pl. 8, 16 vagy 24 árpa genotípust tartalmazó, maximális genetikai diverzitással rendelkező szubpopulációk közvetlenül szekvenálhatók a kiválasztott szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltekre.

Az EcoTILLING módszerrel feltárt genotípusos eredmények mellett szükségessé vált a vizsgált árpa vonalak fenotípusos paramétereinek meghatározása is szárazságstressz alatt. A szárazságtolerancia mértékének tesztelése érdekében összeállítottunk 25 genotípusból álló árpa törzskollekciót, mely részét képezi az EcoTILLING analízishez használt tágabb genotípus kollekciónak. A kiválasztott 25 árpa vonal széleskörű fenotípusos jellemzését üvegházi körülmények között komplex stressz diagnosztikai rendszer használatával genotípusonként 5-5 kontroll illetve stressztelt növényrel két független ismétlésben is elvégeztük.

A hagyományos, vizuálisan és mérésekkel meghatározható fenotípusos tulajdonságok mellett (mint például az érésidő, a termésmennyiség vagy a harvest index) mellett további értékes kísérleti adatok is a rendelkezésünkre állnak a komplex stressz diagnosztikai rendszernek köszönhetően. Meghatároztuk többek között a növények teljes tenyészidő alatti vízfogyasztását, azaz ismerjük a genotípusok vízfelhasználási hatékonyságát. A kísérlet időtartama alatt rendszeresen rögzített digitális felvételek a kontroll és stressz körülmények között nevelt növények valamennyi fejlődési stádiumáról és a fejlődési dinamikájukról is információval szolgálnak. Továbbá részletes adatsorral rendelkezünk a levelek felületi hőmérsékletéről és klorofill fluoreszcenciájáról is, melyek kiértékelése útján meghatározható a genotípusoknak a vízmegvonás hatására bekövetkező fotoszintetikus aktivitás vesztese.

A vizsgált 25 árpa genotípust szántóföldi körülmények között is teszteltük, genotípusonként 4-4 egysoros parcellában öntözött (kontroll) körülmények között, illetve szárazságstressz alatt szintén két független ismétlésben. Szántóföldi körülmények között a megfelelő mértékű stresszhatás kiváltásához szükséges vízhiányt esőárménykoló berendezés segítségével idéztük elő. A 2. ábra a növények virágzásakor készült

fényképeket tartalmaz. A vízmegvonás hatására bekövetkező biomassza tömeg csökkenés minkét esetben jól látható.



2. ábra: A különböző kísérleti rendszerekben nevelt szárazságstressznek kitett és optimális vízellátású növények a virágzás idején.

Kísérleteink lezárulta után elvégeztük a két különböző kísérleti rendszerből származó fenotípusos adatok kiértékelését és egymással való összehasonlítását is. Az együttesen történő ábrázolása nyomán kiderült, hogy a két különböző rendszerből származó adatsorok nagymértékű hasonlóságot mutatnak, a genotípus rangsor légyeges megegyezést mutat. A korreláció mértéke éppen a legfontosabb agronómiai tulajdonság, a terméseredmények esetében a legnagyobb (1. táblázat).

Komplex stressz diagnosztikai rendszer		Automata esőárnyékoló berendezés	
árpa genotípus	szemtermés a kontroll %-ában	árpa genotípus	szemtermés a kontroll %-ában
#1	85,3432282	#66	114,4189698
#60	71,63072776	#60	100,54286
#86	68,65109269	#8	97,92010812
#18	67,34059098	#1	96,54431434
#66	66,22418879	#86	94,01810311
#17	58,41733871	#70	89,33602708
#101	52,00741198	#49	84,94549627
#24	50,32679739	#7	79,60980851
#70	48,03224277	#51	77,80863825
#7	47,69866247	#74	71,12725929

1. táblázat: A komplex stressz diagnosztikai rendszer és az automata esőárnyékoló berendezésből származó terméseredmények alapján felállított rangsorok összehasonlítása az 10 legtoleránsabbnak bizonyult genotípus esetében.

Ezek az egybevágó eredmények egyrészt egymást megerősítve növelik a fenotipizálási adatok hitelességét, másrészt a komplex stressz diagnosztikai rendszer alkalmazhatóságának bizonyítékául szolgálhatnak.

A két rendszer összehasonlításából kapott eredményeinket nemrégiben egy tudományos konferencián is bemutattuk az alábbi címmel:

*”Az üvegházi stresszdiagnosztikai eredmények összehasonlítása a szántóföldön tapasztalt stresszválással”*

*Cseri András, Talpas Krisztina, Törjék Ottó, Mihály Róbert, Pauk János, Cseuz László, Sass László, Vass Imre, Dudits Dénes*

*Mátraházi szeminárium, 2010. november 17-18*

A növényi stressz adaptációban kiemelt jelentősége van a gyökérrendszer felépítésének és funkcionális jellemzőinek. Ezért szükségesnek ítéltük a szárazságtolerancia tekintetében a fenotípus és genotípus szintjén korábban már részletes jellemzett törzskollekció gyökérmövekedési és sejtosztódási paramétereinek meghatározását. Kísérleteinket ozmotikus stressznek, illetve vízmegvonásnak kitett ciszranövényeken végeztük képalkotási és citológiai módszerek segítségével.

A sejtosztódási és növekedési gyökérparaméterek meghatározását szintén a fent említett, részletesen fenotipizált 25 árpa genotípust tartalmazó törzskollekción végeztük



el. A gyökérnövekedési tesztek egyrészt tápoldatot is tartalmazó folyadékkultúrában hajtottuk végre, amelyben a stresszhatást ozmotikumok (mannitol, polietilén-glikol) adagolásával idéztük elő. Másrészt kidolgoztunk egy ún. mikrorhizotronos kísérleti rendszert, melynek segítségével a természetes viszonyokhoz hasonló körülmények között (talajban) nevelt csíranövények gyökérnövekedési dinamikáját megismételhető és egymással összehasonlítható módon tudtuk nyomon követni. Kísérleteinkhez egy felülről nyitott, levehető oldalú, víztiszta anyagból gyártott plexi edényeket használtunk, melyekben a kontroll növényeket megfelelő (60 %-os) vízellátottságú talajban neveltük, míg a szárazságstresszt a mindössze 20 %-os nedvességtartamú talajjal idéztük elő.

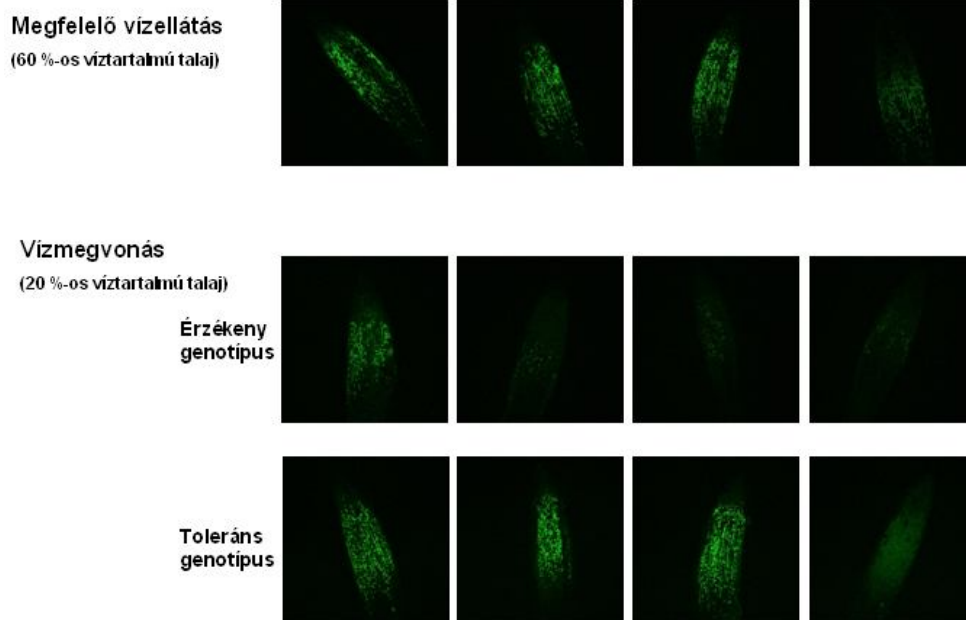


3. ábra: Optimális és alacsony víztartalmú talajt tartalmazó mikrorhizotronban nevelt árpa csíranövények gyökérfejlődése egy toleráns illetve egy szenzitív genotípus esetében.

Az alkalmazott nevelő edény átlátszóságának illetve levehető oldalának köszönhetően lehetőség nyílt a gyökérnövekedés pontos időbeni nyomon követésére digitális fényképezés útján, illetve az osztódásban lévő sejtek arányának meghatározását lehetővé tevő citológiai technikák is a növény lehető legkisebb mértékű károsításával kivitelezhetők voltak. A növekedési tesztek alapján kiválasztott toleráns genotípusokkal

részletes citológia vizsgálatokat végeztünk a sejtosztódási paramétereik meghatározása céljából. Ehhez többek között egy S-fázis specifikus fluoreszcens jelölő anyagot, az 5-etinil-2-deoxiuridint (EdU) alkalmaztunk (Kotogány et al., 2010.). Az eljárás árpa gyökércsúcsra történő optimalizálása után a gyökérnövekedési paramétereik alapján kiválasztott genotípusok sejtosztódási paramétereit is teszteltük.

Kísérleteink során szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk az egyes genotípusok gyökércsúcsában végbemenő sejtosztódásának szárazságstresszre adott reakciójában, amely több esetben korrelációt mutatott az adott genotípus a szárazságtoleranciájának mértékével.



4. ábra: Az S-fázisban lévő sejtek gyakorisága egy érzékeny, illetve egy toleráns genotípus esetében.

A legtöbb genotípus esetében az általánosan tapasztalt stressz reakció a gyökerek növekedésének lassulása, leállása vízhiány esetén. Kísérleteink során azonban sikerült azonosítanunk olyan árpa vonalakat, amelyek gyökérnövekedése jóval kisebb mértékű gátlást szenved kedvezőtlen körülmények között alacsony víztartalmú talajban.

A detektált különbségek sejtbioológiai hátterének feltárása meghatározó szerepet tölthet be a gyökér vízhasznosító képességének, s ezáltal a növény



szárazságtoleranciájának javításában, valamint a szárazságstressz és a sejtosztódás szabályozása között fenn álló kapcsolat mélyebb megértésében. A sejtek transzkript összetételében vízmegvonás hatására bekövetkező változások feltárását RNS szekvenálás segítségével végezzük.

Rendelkezésünkre áll ugyanis egy újgenerációs szekvenciális szolgáltatás, amely lehetővé teszi az RNS molekulákról szintetizált cDNS-ek megszekvenálását és így az egyes transzkriptumok gyakoriságának meghatározását kis mennyiségű szövetminta felhasználásával. A BZAKA BAYGEN: Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetben működtetett (Applied Biosystems SOLiD™ 4.0 System) igénybevételével két, reakciójában eltérő genotípus esetében kívánjuk azonosítani a magasan kifejeződő illetve represszált gének körét.

A genotípusok kiválasztását szárazságstressz alatt tapasztalt gyökérfejlődési dinamika és a sejtosztódási paraméterek részletes elemzése útján illetve a korábbi fenotipizálási adatok együttes figyelembe vételével végeztük el. A szekvenálás valamint az adatok informatikai feldolgozása jelenleg is folyik, melynek során kiemelt figyelmet kívánunk fordítani a sejtciklus gének illetve a gyökér specifikus génekre. A transzkriptum szintjén feltárt genotípusok között fennálló eltérések fontos eredményekkel egészíthetik ki a sejtosztódás és a szárazságstressz kapcsolatáról jelenleg rendelkezésre álló információkat, illetve további erre irányuló kutatások kiindulási alapjául szolgálhatnak.

Kutatásaink eredményeit 2011-ben, az Euphytica nevű szakfolyóirat az alábbi címmel közlésre elfogadta:

*“Allele mining and haplotype discovery in barley candidate genes for drought tolerance”*

Továbbá egy kézirat elkészítése is folyamatban van az alábbi címmel:

*“Comparative analysis of drought response of barley genotypes by a complex stress diagnostic system in greenhouse and automatic rain shelter in field. “*