

**GENOMIKAI ÉS FENOMIKAI MEGKÖZELÍTÉSEK KOMBINÁLÁSA
AZ ÁRPA SZÁRAZSÁGTŰRÉSÉNEK JELLEMZÉSÉBEN**

Ph.D. értekezés

Cseri András

Témavezetők:

Prof. Dr. Dudits Dénes

Dr. Törjék Ottó

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

2013

Szeged

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés.....	7
3. Irodalmi áttekintés.....	12
3.1. A növényeket érő stresszhatások és következményeik.....	12
3.2. A vízhiány okozta károk kivédését lehetővé tevő mechanizmusok.....	13
3.3. A szárazságtűrés genetikai háttere.....	16
3.4. Az EcoTILLING módszer szerepe a genetikai variabilitás feltárásában.....	18
3.5. Az árpa biológia jellemzése.....	20
3.6. Az árpa szárazságtűrése.....	22
3.7. Az árpa és más gabonafélék vízhiány elleni védekezésének lehetőségei	24
3.8. Az árpa szárazságtűrésében szerepet játszó faktorok, génjelöltek.....	25
4. Célkitűzés.....	27
5. Anyagok és módszerek.....	28
5.1. EcoTILLING analízis.....	28
5.1.1. Az EcoTILLING analízishez használt árpa genotípus kollekció összeállítása.....	29
5.1.2. Genomiális DNS izolálás és minta előkészítés.....	33
5.1.3. PCR amplifikáció, fluoreszcens jelölés.....	34
5.1.4. Heteroduplex képzés.....	34
5.1.5. Heteroduplex molekulák enzimes kezelése.....	35
5.1.6. Minták tisztítása, előkészítése.....	35
5.1.7. Termékek méret szerinti elkülönítése, detektálás.....	36
5.1.8. A génjelöltek kiválasztása	37
5.1.9. Primerek tervezése a célrégióra.....	38
5.1.10. Haplotípusok azonosítása.....	39
5.2. Molekuláris markerek kifejlesztése és a genotípus kollekció genotipizálása.....	40
5.2.1. Molekuláris marker készlet.....	40
5.2.2. A genotípus kollekció ismételt genotipizálása.....	40
5.3. A genotípus-törzskollekció fenotipizálása.....	42
5.3.1. A genotípus részkollekció összeállítása.....	42
5.3.2. Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer.....	43
5.3.2.1. Kísérleti körülmények.....	43

5.3.2.2. A növények vízfelhasználásának meghatározása.....	43
5.3.2.3. A pixel alapú zöldfelület jellemzése digitális fotográfiával.....	44
5.3.2.4. Levélhőmérséklet meghatározás.....	44
6. Eredmények.....	45
6.1. A szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó gének természetes variabilitásának vizsgálata EcoTILLING módszerrel.....	45
6.1.1. A génjelöltekre tervezett amplikonok EcoTILLING vizsgálata.....	45
6.1.2. Az azonosított haplotípusok szekvenálása és a polimorfizmusok detektálása.....	46
6.1.3. A polimorfizmusok gyakoriságának alakulása a vizsgált amplikonokban.....	50
6.2. Könnyen detektálható genetikai markerek kifejlesztése.....	50
6.2.1. Markerfejlesztés az aldóz-reduktáz (HvARH1) génre.....	51
6.2.2. Markerfejlesztés a HvSRG6, a HvDRF1 és a HVA1 génre.....	54
6.3. Molekuláris markerekkel történő ismételt genotipizálás.....	54
6.4. Variábilis árpa genotípus törzskollekció stressz reakciójának meghatározása és széleskörű fenotípusos jellemzése.....	56
6.4.1. A pixel alapú zöldfelület becslése digitális felvételek alapján.....	58
6.4.2. A növénymagasság változása a szárazság stressz hatására.....	62
6.4.3. A transzspirációs aktivitás becslése a felületi levélhőmérséklet mérésével.....	62
6.4.4. A termésmennyiség változása a szárazság stressz hatására.....	66
6.4.5. A növények vízháztartásának paraméterei.....	68
6.4.5.1. A vízfelvételi profilok rögzítése.....	68
6.4.5.2. A regisztrált vízfelhasználási profilok meghatározása.....	69
6.4.5.3. Vízhatszósítási hatékonyság alakulása a szárazságstressz hatására.....	71
6.4.6. A szemtermés és a vízhatszósítási hatékonyság közötti korreláció.....	72
6.4.7. További fontos mért paraméterek alakulása szárazság stressz hatására.....	73
6.4.7.1. A szárazság stressz ezerszemsúly változására kifejtett hatására.....	74
6.4.7.2. A harvest index alakulása vízmegvonás esetén.....	75
6.5. A fontosabb fiziológiai és agronómiai paraméterek közötti korreláció.....	76
6.6. Az EcoTILLING módszerrel feltárt haplotípus adatok illetve a szárazság stressz alatt mért fenotípusos paraméterek közötti kapcsolat.....	77
6.6.1. A <i>HvA1</i> gén haplotípusainak és a pixel alapú zöldfelület kapcsolata.....	78
6.6.2. A termés stabilitással összefüggésbe hozható haplotípus-fenotípus kapcsolatok.....	79
6.6.2.1. A <i>HvDRF1</i> gén haplotípus-termésszabotás összefüggése.....	81

6.6.2.2. A <i>HvNHXI</i> gén haplotípus-termésstabilitás kapcsolata.....	82
6.6.3. A haplotípusok és a fenotípusos paraméterek asszociációs vizsgálata.....	83
7. Eredmények értékelése.....	86
7.1. Az EcoTILLING technológia alkalmazhatósága a szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltek vizsgálatában.....	86
7.2. Az EcoTILLING módszerrel feltárt genetikai variabilitás összegző elemzése.....	87
7.3. A kifejlesztett markerkombinációk hasznosíthatósága.....	88
7.4. A stressz paraméterek alakulásából levonható következtetések.....	89
7.5. A fontosabb fiziológiai és agronómiai paraméterek közötti kapcsolat, a termőképesség javításának lehetőségei.....	90
7.6. Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatából fakadó előnyök.....	92
7.7. A haplotípus-fenotípus kapcsolatok kutatásának jelentősége.....	94
8. Összefoglalás.....	96
9. Summary.....	99
10. Irodalomjegyzék.....	102
11. Publikációs lista.....	113
12. Köszönetnyilvánítás.....	114

1. Rövidítések jegyzéke

- bp - bázis pár
- CAPS - cleaved amplified polymorphic sequence (amplifikált polimorf szekvencia hasítása)
- DNS - dezoxi-ribonukleinsav
- dNTP - dezoxiribonukleotid-trifoszfát
- dTTP - deoxitimidin-trifoszfát
- dUTP - deoxiuridin-trifoszfát
- EcoTILLING - Eco-Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (Természetes populációk egyedeinek genomjában meglévő eltérések kimutatásán alapuló technika)
- EDTA - etiléndiamin-tetraecetsav
- F - forward primer
- Flu-12-dUTP - fluoreszcens festékkel jelölt deoxiuridin-trifoszfát
- HI - harvest index
- HvA1 - *Hordeum vulgare* L. gene (a késői embriogenezisben gyakori, ún. LEA fehérjét kódoló gén)
- HvARH1 - *Hordeum vulgare* L. gene for aldose reductase (aldóz-reduktáz enzimet kódoló gén)
- HvDREB1 - *Hordeum vulgare* L. dehydration responsive element binding protein 1 (a dehidratáció során aktiválódó génszakaszhoz kötődő fehérjét kódoló gén)
- HvDRF1 - *Hordeum vulgare* L. AP2 transcriptional activator gene (AP2 transzkripciósfaktort kódoló gén)
- HvNHX1 - *Hordeum vulgare* L. mRNA for sodium/proton antiporter (nátrium-proton antiporter fehérjét kódoló gén mRNS szekvenciája)
- HvNUD - *Hordeum vulgare* L. NUD putative ethylene-responsive transcription factor (etilénre reagáló feltételezett transzkripciósfaktort kódoló gén)
- HvSRG6 - *Hordeum vulgare* L. stress responsive gene protein 6 (6-os számmal jelzett fehérjét kódoló, stresszre reagáló gén)
- HVP1 - *Hordeum vulgare* L. mRNA for vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase (vakuoláris proton-inorganikus pirofoszfátáz fehérjét kódoló gén mRNS szekvenciája)

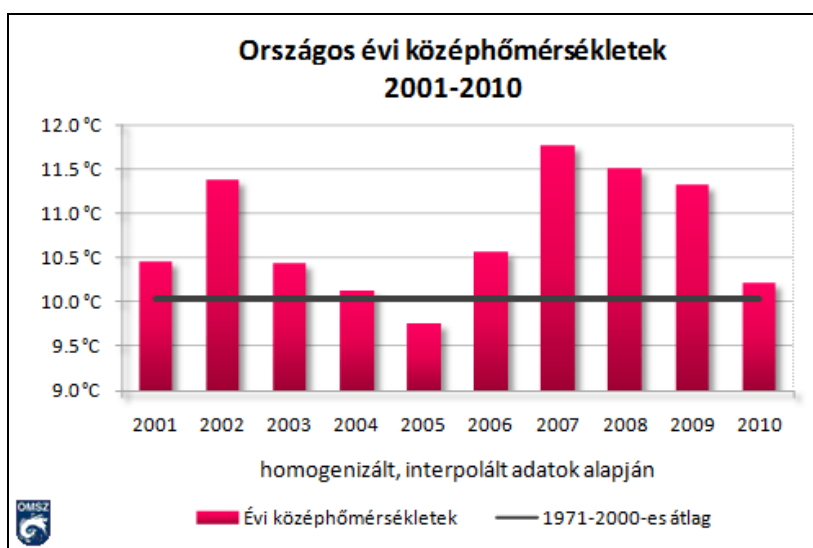
- HvPPRPX - *Hordeum vulgare* L. fungal pathogen induced mRNA for pathogen-related protein (patogén gombák által indukált fehérjét kódoló gén mRNS szekvenciája)
- InDel - inszerció/delécio
- LEA - late embryogenesis abundant (az embriófejlődés késői fehérjei)
- MAS - marker assisted selection (markerekkel támogatott szelekció)
- mRNS - messenger RNS (hírvivő RNS)
- SNP - single nucleotide polymorphism (egy nukleotidnyi szekvencia polimorfizmus)
- RIL - recombinant inbred line (rekombináns beltenyésztett vonal)
- RN-áz – ribonukleáz enzim
- RNS – ribonukleinsav
- ROS - reactive oxygen species (reaktív oxigén fajták)
- PCR - polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
- QTL - quantitative trait loci (mennyiségi tulajdonság kialakításában résztvevő kromoszóma régió)
- R - reverz primer
- S - extenziós primer
- SSLP - simple sequence length polymorphism (egyszerű szekvencia hosszúság polimorfizmus)
- Taq - *Thermus aquaticus* polimeráz
- TILLING -Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (célzottan előidézett helyi sérülések genomokban)
- TAE - Tris-acetát-EDTA puffer
- TBE - Tris-borát-EDTA puffer
- TE - Tris-EDTA puffer
- Tris - tris-hidroximetil-aminometán
- WUE - water use efficiency (vízhasznosítási hatékonyság)

2. Bevezetés

Korunk világának rohamosan szaporodó népessége növekvő élelmiszer igényt támaszt, ami végső soron az élelmiszerként vagy éppen takarmányként hasznosított növényi termékek iránti bővülő keresletben jelenik meg. A legkézenfekvőbbnek tűnik, a termesztett növények termőképességének fokozása illetve az intenzív termesztési technológiák előtérbe helyezése. Kérdés azonban, hogy mindez jelenthet-e megoldást.

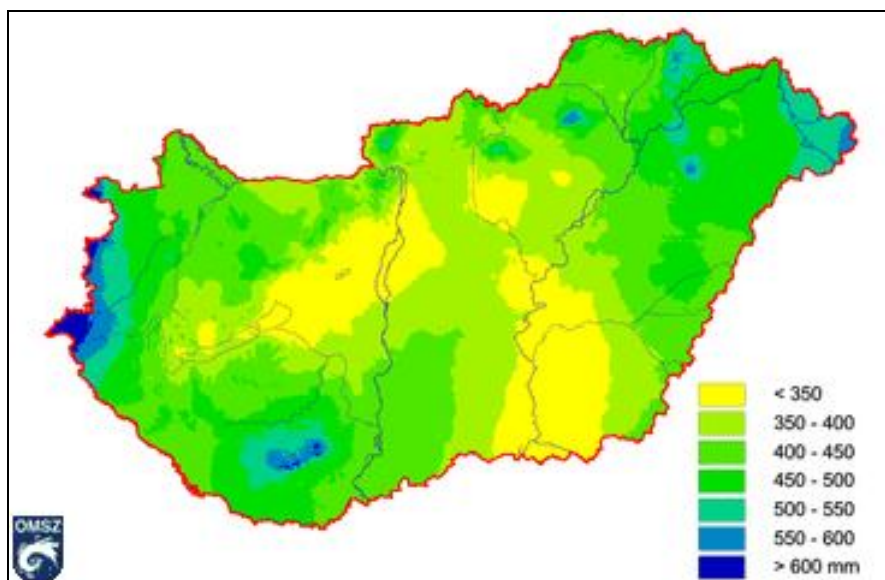
A növekvő szükségletek ellátása céljából valószínűleg szükséges bizonyos növények termesztési területének bővítése is. Ez azonban számos egyéb nehézség mellett szükségszerűen együtt jár az adott növényfaj számára optimálisnak tekinthető környezeti feltételek megváltozásával. Emellett természetesen nem feledkezhetünk meg a gyakran említett klímaváltozásnak tulajdonított időjárási szélsőségek egyre gyakoribb megjelenéséről sem. A globális éghajlatváltozás hátterében meghúzódó okokat illetően a tudományos megítélés korántsem egységes, a témáról jelenleg is élénk vita folyik, amely során a legkülönbözőbb érvek és érdekek ütköznek. Napjainkban a globális felmelegedésként köztudatba került klímaváltozás jelentős, gyakran negatív hatást gyakorol a termesztett növények hozamára, ezáltal veszélyezteti az emberiség élelmiszer ellátásának biztonságát.

Vitán felül áll azonban, hogy a légkör átlaghőmérséklete világszerte és hazánkban is összességében emelkedő tendenciát mutat (1. ábra), ezzel párhuzamosan pedig az időjárási szélsőségek előfordulásának gyakorisága és intenzitása is növekszik.



1. ábra: Az új évezred első évtizedének átlaghőmérsékleti értékei a korábbi évtizedek átlagához viszonyítva (forrás: Országos Meteorológiai Szolgálat)

Hazánkban ugyanakkor az utóbbi években az átlagosnál kevesebb csapadék hullott (2. ábra), amely ráadásul gyakran szélsőséges időbeni eloszlásban érkezett. A komoly hőséggel együtt jelentkező, hosszú időn át tartó csapadékhiány a növények súlyos vízháztartási zavarát okozza, mely végső soron a terméseredmények csökkenéséhez vezet. Ennek következtében a csapadékhiány az elmúlt években súlyos aszálykárokat okozott a mezőgazdasági kultúrákban.



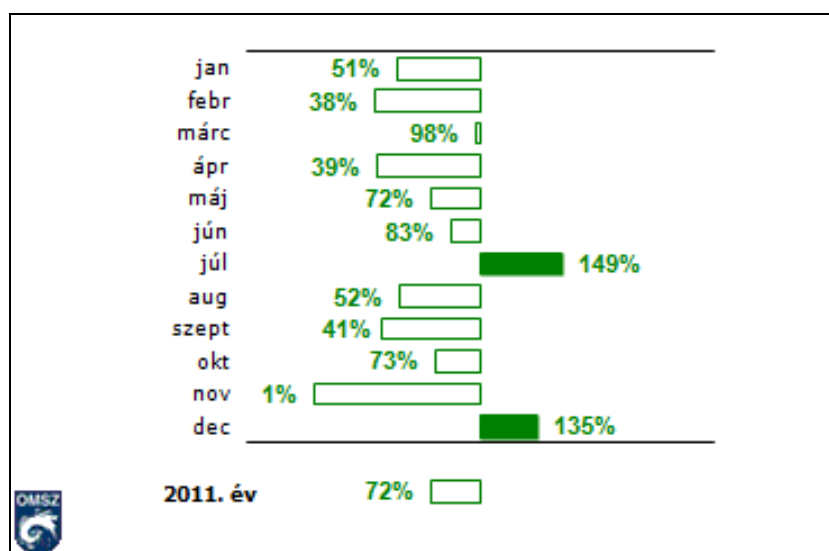
2. ábra: A 2011. évi csapadékösszeg alakulása hazánkban (forrás: Országos Meteorológiai Szolgálat)

Az aszály által hagyományosan a leginkább fenyegetettnek számító tavaszi vetésű szántóföldi növények (kukorica, napraforgó) mellett a korábban kevésbé aszályérzékenynek tekintett őszi illetve kora tavaszi vetésű kalászosok is jelentős terméskieséssel reagáltak az elmúlt évek csapadékhiányára. Ennek oka részben a talajok tartalék vízkészletének kimerülése, amely a korábban megszokottaktól eltérően a téli időszakban sem pótlódik megfelelő mennyiségben.

Ezen kívül a lehulló csapadék időbeni eloszlását tekintve a sokéves átlaghoz viszonyított legnagyobb negatív eltérés a tavaszi hónapokban figyelhető meg (3. ábra), mely időszak éppen egybeesik az árpa legintenzívebb vegetációs időszakával. A csapadékhiány által előidézett vízhiány jelentősen visszafogja a növények fejlődését, mely a fenológiai jellegekben is szembetűnő módon nyilvánul meg (csökkent növénymagasság, kisebb zöldtömeg, korábbi kalászosítás, kisebb növényenkénti kalászsúly, alacsonyabb kalászonkénti

szemszám), végső soron pedig a várt terméshozamtól való elmaradásban jelentkezik a vízhiány hatása.

További fontos termést meghatározó tényező a tavaszvégi, nyáreleji szemfeltöltődési időszak is, amely éghajlatunkon éppen a legcsapadékosabb hónapokra esik. Az elmúlt években azonban az ekkor lehulló csapadékmennyiség is gyakran elmaradt az átlagos szinttől, melynek következtében a szemkitelítődés akadályozottá vált, ami hozzájárult az alacsonyabb terméseredmények kialakulásához.



3. ábra: A havi csapadékösszegek alakulása 2011-ben az 1971-2000-es időszak átlagának normál százalékában 58 állomás homogenizált, interpolált adatai alapján. (forrás: Országos Meteorológiai Szolgálat)

A fenti okokból következően jelenleg hazánkban is az egyik legfontosabb nemesítési cél új, kedvezőbb szárazságtűréssel rendelkező növény-, közöttük árpafajták létrehozása, ugyanis mára a termesztett növények terméspotenciáljának kihasználásában a szárazság vált az egyik legjelentősebb korlátozó tényezővé.

Az előrelépést nehezíti, hogy a szárazságtűrés fiziológiai háttere részben még feltáratlan, illetve hatásai gyakran átfedést mutatnak más abiotikus stressz-faktorok hatásaival. Ez nehezen áttekinthető helyzetet teremt, és sokszor gátat szab a nemesítői törekvéseknek. Továbbá a lassú genetikai előrehaladás okaként említendő, hogy a szárazságtolerancia több gén által meghatározott, kvantitatív jellegű tulajdonság, azaz számos QTL (quantitative trait locus) azonosítható különböző kromoszómákon, amelyek kiemelt szerepet játszanak a vízhasznosítás genetikai szabályozásában.

A nemesítői törekvésekben a jövőben a jelenleginél is nagyobb szerep juthat a stressztűrés, elsősorban a szárazságtolerancia fokozásának, mivel a termőképesség elsődlegesen függhet az adott fajta vízgazdálkodásától.

Ezek a többtényezős célok meglehetősen komplex feladat elé állítják a növénynemesítéssel foglalkozó szakembereket. Az eredményességet elősegítheti a genomikai és fenomikai módszerek integrációja. Tester és mtsai. (2010) szerint ezen módszerek együttes alkalmazásainak előnye egyrészt abban keresendő, hogy megteremtheti a lehetőségét a nagyobb, már jellemzett genetikai variabilitás bevonásának a fajták előállítási folyamatába, másrészt a módszerek kombinált használatával mód nyílik új, hatékony nemesítési technikák (molekuláris markerrel támogatott szelekció) eredményesebb alkalmazása előtt.

A szárazságtűrésre történő nemesítés egyik legfontosabb eszköze lehet a szárazságtűrés szempontjából kedvező hatású allélvariánsok - elsősorban genomikai módszerekkel végzett - megtalálása (Cattivelli és mtsai. 2008) és ezek keresztezés során történő bevitele a nemesítési tenyészanyagokba, valamint molekuláris markerekkel végzett nyomon követésük a szelekció során.

A gabonafélék szárazságtoleranciájának vizsgálatában alkalmazott genetikai vizsgálati módszerek töretlen fejlődést mutatnak. Az újonnan kidolgozott, és a korábbiaknál hatékonyabban alkalmazható, nagy teljesítményű genomikai eljárások megjelenése új lendületet adott a kvantitatív jellegű tulajdonságokat befolyásoló gének, géntermékek azonosításához (Fleury és mtsai. 2010).

Az új generációs szekvenálási módszerek illetve a bioinformatikai eszközökkel történő adatfeldolgozás alkalmazásával a vizsgálatok egyre költséghatékonyabbá válnak (Bräutigam és mtsai. 2010). Jelenleg azonban az árpa genomról még nem áll rendelkezésre teljes szekvencia információ, de a mind hatékonyabb technikák segítségével nagyszabású transzkriptum és fehérje vizsgálatra egyaránt lehetőség nyílik (Shinozaki és mtsai. 2007). Ezen vizsgálatok számos, a szárazságtűrésben valószínűsíthetően szerepet játszó génjelölt megtalálását teszik lehetővé.

A génjelöltek szerepének tisztázásában, illetve a szárazságtűrésre történő nemesítésben kulcskérdés a genotípusok (értékes génvariánsokat hordozó növények és egyéb nemesítési anyagok) szárazságtűrő képességének megbízható meghatározása. A fajták előállítását ugyan folyamatos fenotipizálási tevékenység kíséri végig, mégis a jelleg komplexitásából eredően a szárazságtolerancia kvantitatív értékelése csupán speciális feltételek között végezhető el. A szárazság stressz kontrollált körülmények között mesterségesen indukálható Pl. üvegházban vagy automata esőárnyékoló berendezés segítségével.

Az utóbbi időben növénynemesítéssel illetve a hozzá kapcsolódó alaptudományokkal foglalkozó szakemberek mellett az élettudományok számos más területén tevékenykedő kutatók emelik ki publikációikban a fenotípusos paraméterek pontos és hatékony meghatározásának jelentőségét (Houle és mtsai. 2010). A fenotípus széleskörű jellemzése a morfológiai, fiziológiai illetve a molekuláris paraméterek meghatározására egyaránt kiterjedhet (Fabre és mtsai. 2011, Hartmann és mtsai. 2011.) A fenotípus és a genotípus közötti kapcsolat feltárását nagymértékben elősegítheti az abiotikus stressz toleranciára irányuló vizsgálatok esetén a nagy kapacitású, részben, vagy teljesen automatizált fenotipizálási rendszerek alkalmazása (Munns és mtsai. 2010).

A fenomika, mint önálló tudományág létrejötte nem csupán a kutatók szándékán múlik, hanem éppen a genomika rohamos fejlődéséből fakadó igény következménye. Figyelembe véve a genomika jelenlegi fejlettségi szintjét és a nemesítési célokat, számos kutatás irányul a genetikai háttér és a környezet kölcsönhatása nyomán kialakuló fenotípus paramétereinek precíz felvételezésére.

A molekuláris genetikai módszerekre alapozott hatékony nemesítési technikák fejlődésével egyre inkább szükségessé válik a szárazságtolerancia tesztelését lehetővé tevő eljárások alkalmazása (Salekdeh és mtsai. 2009.). Peleman és van der Voort (2003) szerint a markerekre alapozott szelekció során az új fajták előállításához szükséges időt is jelentősen lehet rövidíteni, ha az allélikus variabilitás feltárásával párhuzamosan kiterjedt fenotipizálási tevékenység folyik.

A genomikai és a fenomikai megközelítések összekapcsolásának a szárazságstressz tolerancia vizsgálatában, azaz a nemesítési célként megfogalmazott kedvező tulajdonságok genetikai hátterének megismerésében a markerekre alapozott szelekció során az előnyös tulajdonságot hordozó utódok hatékonyabb kiválasztása jelentősen elősegítheti, gyorsíthatja az új kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező fajták megszületését (Roy és mtsai. 2011).

A fenti tudományos háttér figyelembevételével a jelen munkánk arra irányul, hogy az árpa néhány kiválasztott, szárazságstresszre aktiválódó génje esetében az EcoTILLING megközelítés segítségével megteremtse a metodikai alapokat az allélvariánsok azonosításához illetve tesztelje azt a Komplex Stressz Diagnisztikai Rendszert, amely képalkotási módszerekkel értékeli az árpa genotípusok fejlődését vízhiányos körülmények között. A kapott kísérleti adatok lehetőséget nyújtanak arra, hogy kapcsolatot keressünk a vizsgált gének haplotípusai és a szárazságstresszel szembeni érzékenység között.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A növényeket érő stresszhatások és következményeik

A Selye János által kidolgozott stresszdefiníció és általános adaptációs szindróma elmélet elsősorban az emberi életműködésekre vonatkozott, mely a stresszor → stressz → stressz reakció egymásból következő hármas ok-okozati egységére épült. Azóta a jelenséget általános érdeklődés övezi, megismerése és kivédése céljából számos kutatás folyt, és zajlik jelenleg is. Időközben világossá vált, hogy a stresszjelenség az egész élővilágban általános érvényű, a megváltozott feltételekhez történő folyamatos alkalmazkodás (akklimatizáció) az életben maradás alapfeltétele, az adaptáció pedig egyben a törzsféjlődés egyik mozgatórugója.

Az élővilág részeként a növények is számos olyan környezeti hatásnak vannak kitéve, melyek az optimálistól jelentősen eltérő körülményeket teremtenek számukra, és amelyeket helyhez kötött életmódjukból adódóan túlélésük érdekében tolerálniuk kell.

A növényeket érő stresszhatások első megközelítésben más élőlények által kiváltott (biotikus) és környezeti hatások következményeként jelentkező (abiotikus) hatások lehetnek (Levitt 1972). Jelenleg az abiotikus stresszhatások közé tartozó szárazságstressz világviszonylatban is az egyik legkomolyabb gazdasági jelentőséggel bíró, termesztett növényeket károsító környezeti faktor. A szárazságtűrés fogalma sokféleképpen értelmezhető.

A víz felvehetőségét a növény szövetei illetve a talaj közötti vízpotenciál különbség határozza meg (Verslues és mtsai. 2006). Szárazságstresszről akkor beszélhetünk, ha a növény vízmérlege felborul, azaz a vízvesztés sebessége meghaladja a vízfelvétel kapacitását. Ez általában akkor következhet be, ha nem áll rendelkezésre elegendő felvehető vízmennyiség, amely a gyakran fokozott mértékű transzspirációs vízvesztést pótolni tudná.

A vízhiány által előidézett stressz hatás általában nem önmagában jelentkezik, gyakran magas hőmérséklet által okozott stresszel, magas só koncentrációval esetleg alacsony hőmérséklettel társul, illetve a felsorolt stresszhatások járulékos következményeként alakul ki. A csapadékhiány miatt bekövetkező nagyfokú vízhiány az aszály, ami gyakran magas hőmérséklet okozta stresszel társul. Hosszan tartó csapadékhiány következtében a talaj mélyebb rétegei is kiszáradhatnak. A vízvesztést fokozhatja továbbá az alacsony légköri páratartalom és magas hőmérséklet is.

A termesztett növények esetében a szárazságtűrés leginkább a vízhiány esetén mért terméshozam csökkenéssel jellemezhető (Passioura 1996). A szárazságstressz és az azt

gyakran kísérő hőstressz meglehetősen komplex hatású a gabonafélék életműködéseire nézve, de végső soron valamennyi károsodás a termésmennyiség csökkenésében nyilvánul meg (Barnabás és mtsai. 2008).

A talaj csökkenő víztartalma esetén elsőként a gyökérzet érzékeli a vízhiányt. A talaj víztartalmának csökkenésével fokozatosan akadályozottá válik a víz és az ásványi tápelemekhez való hozzájutás, amely a növény vízháztartásának felborulásához, illetve tápanyagfelvételi zavarokhoz vezethet. Ezek együttesen a normális anyagcsere különböző mértékű megváltozását eredményezhetik.

A vízhiány az árpa gyökér szöveteiben fokozott abszcizinsav termelést indukálhat, ami fokozott gyökérnövekedést idéz elő. Ezáltal lehetővé válhat a mélyebb talajrétegekben lévő víztartalékok hasznosítása. Az abszcizinsav a föld feletti növényi részekbe transzportálódva a csökkent víztartalommal együtt a gázcseregyűlések záródását okozza, amely a gázcsere csökkenése útján a fotoszintézis gátlását eredményezi (Chaves és mtsai. 2008). E folyamat eredményeként végül a szénhidrát szintézis is akadályozottá válik, ezzel együtt a sejtosztódási és megnyúlási folyamatok is gátlást szenvednek.

A megváltozott körülmények hatására illetve az azokhoz történő alkalmazkodás során számos molekuláris szintű folyamat is meghúzódik a fiziológiai változások és reakciók hátterében. Átfogó hatású, génexpresszió szintű változások következnek be a vízhiány káros hatásainak kivédése céljából, ezek eredményeként pedig morfológiai, fiziológiai és biokémiai szintű stresszreakciók jönnek létre (Shao és mtsai. 2008).

Természetesen a vízhiány illetve a hőstressz a generatív szervekre is jelentős hatást gyakorol. Kedvezőtlenül befolyásolhatja a megtermékenyítés folyamatát, valamint az embrió és az endospermium fejlődését is.

3.2. A vízhiány okozta károk kivédését lehetővé tevő mechanizmusok

A növények vízhiányra adott reakciója és az akklimatizáció folyamata meglehetősen sokrétű. A vízhiány következtében illetve káros hatásainak mérséklése érdekében különböző morfológiai, sejtszintű biokémiai illetve génexpressziós változások következnek be. Ezek közül legszembevetőbbek a morfológiai változások, melyek egyrészt a sejtek turgorvesztése és károsodása (hervadás, kiszáradási tünetek) következtében, másrészt az akklimatizáció (a párologtatás és a fotoszintetikus aktivitás csökkenése, hajtás és gyökér növekedési arányának

megváltozása) vagy a túlélés, illetve a fajfenntartás érdekében (lerövidült életciklus, felgyorsuló termésképzés) következnek be.

Ezeknek a folyamatoknak a hátterében a növényt felépítő sejtek és szövetek anyagcseréjének, metabolizmusának megváltozása áll, melyek különböző jelátviteli rendszerek hormonális válasza, végső soron pedig részben transzkript szintű történésekre vezethetők vissza. A vízhiány kedvezőtlen hatásainak kivédését lehetővé tevő folyamatok beindításában fontos szerep jut a génműködést szabályozó transzkripciós faktoroknak. A stresszreakció során nagyszámú gén koordinált együttműködésére van szükség, ezért a stresszválaszban résztvevő gének promóterszekvenciái bizonyos transzkripciós faktorok kapcsolódási szekvenciáit tartalmazzák (Kim és mtsai. 2011). Az ún. *cis* szabályozó elemekhez stressz hatására kötődő transzkripciós faktorok összehangolva beindítják az egyes stresszgének működését és ezzel hatékonyan és viszonylag gyorsan képesek az akklimatizációs folyamatokat aktiválni.

A vízhiány elleni védekezésben kulcsszerepet tölt be a transzspirációs aktivitás szabályozása (Schroeder, 2001). A gázcseré nyílásokon keresztül végbemenő légcseré egyben az egyik legfontosabb vízvesztést előidéző folyamat. Ezért a szárazsághoz történő alkalmazkodás során kiemelkedő szerep jut a sztómák zárósejtjeinek nyitottsága útján szabályozott légcseré kontrolljának. Gabonafélékben a sztómákon keresztül lezajló légcseré szabályozása meghatározó jelentőségű a termésmennyiség kialakítása szempontjából (Blum 2009).

A légrések nyitottságának szabályozásában funkciója van bizonyos növényi hormonok által hordozott kémiai szignáloknak. Ezen jelmolekulák közül a legnagyobb jelentőséggel az abszcizin sav rendelkezik, amely vízhiány hatására a gyökérben termelődik, majd a xilémen keresztül transzportálódva a földfeletti részekben - egyik fontos hatásaként - a sztómák zárása útján mérsékli a transzspiráció miatt bekövetkező vízvesztést (Schachtman és Goodger 2008). A hormon szerteágazó hatásmechanizmusának eredője a gyökérnövekedés fokozódása és vízfelvétel emelkedése, illetve a vízvesztés mérséklése, ezáltal képes emelni a növény vízpotenciálját. Az abszcizin sav katabolizmusának és homeosztázisának szabályozása kiemelt jelentőségű a gabonafélék stressztoleranciájának kialakításában (Ji és mtsai. 2011).

A növényekben, az őket érő környezeti stressz hatásokkal szembeni rezisztencia fokozása érdekében számos más védelmi mechanizmus is megtalálható (Smirnov és mtsai. 1998). A csökkenő vízpotenciálból eredő akadályozott vízfelvétel helyreállítása, illetve a víz

megtartása céljából a sejtekben kompatibilis ozmotikumként funkcionáló vegyületek képződhetnek; Pl: aminosavak (prolin), betain, cukrok (trehalóz), cukor-alkoholok (mannit, szorbit) (Chen és Murata 2002).

A vízhiány hatása sejtszinten is megmutatkozik, szinte valamennyi sejtalkotó makromolekulára (fehérjék denaturációja, membránok integritásának elvesztése) és anyagcsere folyamatra káros hatást fejt ki. Ezen hatások és következményeik kivédésére olyan fehérjék, mint például a LEA (Late Embryogenesis Abundant) fehérjék, melyek felületükön vizet és benne oldott ionokat megkötik, így képesek fenntartani a sejtalkotó makromolekulák szerkezeti integritását, ezáltal megőrizik funkcionális épségüket (Xu és mtsai. 1996; Hundertmark és Hinch 2008). Alapvető szerepükből adódóan az ozmotikumként és védő fehérjeként funkcionáló vegyületeknek és fehérjéknek kiemelkedő szerepük lehet a szárazság tolerancia fokozásában (Jinyou és mtsai. 2004).

A sejtekben rendkívül sokrétű feladatot töltenek be a chaperonok (hőshock fehérjék) azzal, hogy esszenciális jelentőségű fehérjemolekulák működéséhez szükséges konformációját stabilizálják. Ez a fehérje csoport a normális sejt működés esetén is részt vesz a fehérje molekulák funkcióképes szerkezetének kialakításában és fenntartásában, de szerepük különösen jelentős vízvesztés esetén (Demirevska és mtsai. 2008).

A növényi sejtekben fiziológiai körülmények között bizonyos anyagcsere-folyamatok melléktermékeiként folyamatosan keletkeznek szabadgyökök, melyek semlegesítését speciális antioxidáns enzimszisztem végzi. Ezen kívül a növényeket érő stresszhatások általános következménye a reaktív oxigén származékok és egyéb szabadgyökök fokozott képződése és az ennek eredményeként a sejtben belüli oxidatív körülmények miatti oxidatív stressz kialakulása. A természetes körülmények között jelenlévő, illetve képződő oxigén molekulák hatására normál fiziológiai állapotban is redukált, rendkívül erős és reakcióképes oxidálószerke képződnek. A szövetekben megtalálható erősen reakcióképes oxidáló vegyületeket összefoglaló néven reaktív oxigénformáknak (ROS) nevezzük. Két főbb csoportjukat szokás megkülönböztetni: (i)- szabadgyökök (szuperoxid gyök, hidroxil gyök, perhidroxil gyök, alkoxi gyök) (ii)- molekuláris formák (hidrogén-peroxid, szinglet oxigén) (Gill és Tuteja 2010).

A stresszhatások következményeként keletkező fokozott szabadgyök képződés nagymértékben károsíthatja a sejt anyagcsere folyamatait, illetve makromolekuláinak (lipidek, fehérjék, DNS) károsítása útján is komoly élettani hatással bírhat. Az oxidatív stressz egyik

legjelentősebb károsító hatása növények esetében a fotoszintetikus apparátus funkciójának gátlásán keresztül nyilvánul meg.

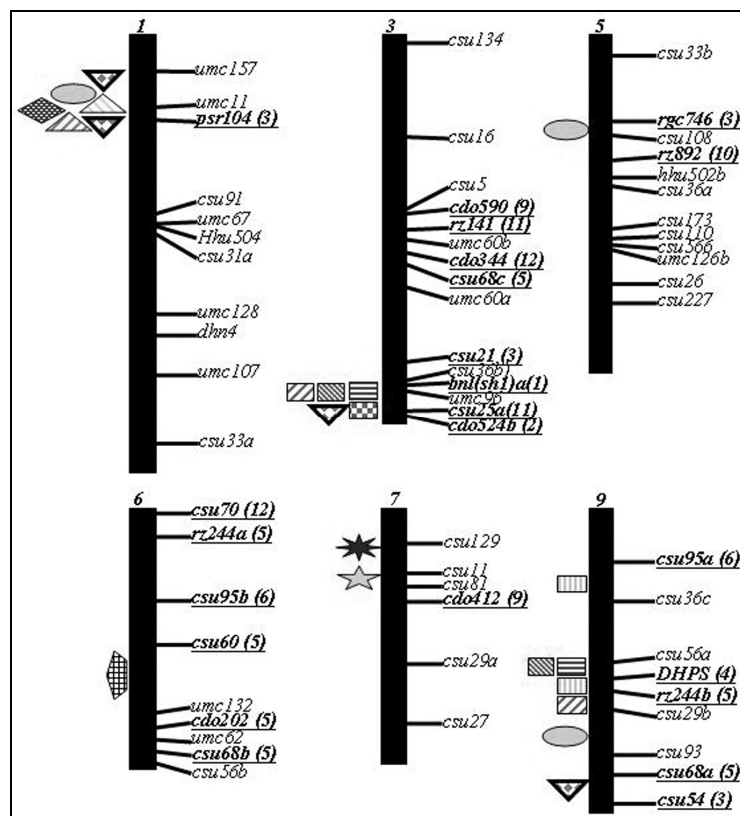
A keletkezett káros reaktív vegyületek semlegesítésére a sejtekben számos antioxidáns hatású anyag (Pl: karotinoidok, tokoferol, aszkorbinsav) illetve a szabadgyökök semlegesítését végző enzim (Pl: szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz, kataláz enzimek) található (Apel és Hirt 2004). Gabonafélék esetében bizonyos antioxidáns enzimek sejtekben mért szintjei egyértelmű összefüggést mutatnak az adott genotípusok szárazság toleranciájával (Bencze és mtsai. 2011), ilyenek a természetes körülmények között az árpában is megtalálható aszkorbát peroxidáz, kataláz, glutathion reduktáz és glutathion-S-transzferáz enzimek.

3.3. A szárazságtűrés genetikai háttere

A szárazság fent említett hatásainak kivédésére vagy mérséklésére irányuló változások hátterében természetesen minden esetben génszintű változások is állnak. Ezeknek a változásoknak megértése valamint a fenotípusos és génszintű történések közötti összefüggések kiderítése rendkívül komplex feladat.

A szárazságtűrés kvantitatív jellegű tulajdonság, azaz kialakításában számos gén játszik szerepet. A tulajdonság molekuláris háttere teljes egészében nem tisztázott. A helyzetet nagymértékben nehezíti, hogy a kialakításában szereplő jelátviteli utak gyakran nagymértékben átfednek más abiotikus (magas és alacsony hőmérséklet, magas só koncentráció, UV sugárzás) és biotikus stresszfaktorokéval.

A szárazságtűrést, mint rendkívül összetett jelleget befolyásoló fenotipikus tulajdonságok igen sokrétűek, így számos kromoszómális régió gyakorol közvetlenül vagy közvetve befolyást a szárazság toleranciára. Az árpa esetében nem áll rendelkezésre átfogó jellegű géntérkép, ezért a kukorica példáján keresztül szemléltethető a jelleg sokszínűsége. A kukorica 10 kromoszómája közül 6 kromoszómára térképeztek olyan lókuszokat, amelyek részt vesznek a vízhiányra adott stresszválaszban, illetve az ellenállóképesség kialakításában (5. ábra).



5. ábra: A kukorica hat kromoszómáján feltérképezhetők olyan régiók, amelyek befolyásolják a vízhiányra adott stresszválaszt, a növények ellenállóképességét. : termés; : levélméret; : gyökér száraztömeg; : zöldtömeg; : gyökérsűrűség; : levél abszcizinsav-tartalom; : relatív víztartalom; : ozmotikus potenciál; : cukorkoncentráció (Az ábra Rahman és mtsai. 2011 nyomán készült).

Az árpa genomjában több, a szárazság toleranciát befolyásoló QTL régió található, melyek elsősorban 2H és 5H kromoszómákon QTL klaszterekbe tömörülnek. A QTL régiók azonban összességében a genom közel felét lefedik. Mivel tehát a szárazságtűrés rendkívül komplex jelleg, ezért a kialakításában részt vevő faktorok vizsgálatához genomikai eszközök szükségesek (Tuberosa és Salvi 2006).

A növények szárazság stresszre adott alapvető, sejtszintű válaszreakciója bizonyos gének expressziójának pozitív vagy éppen negatív irányban történő módosítása. Ennek következtében bizonyos biokémiai folyamatok megváltoztatása útján a növény fiziológiai paramétereiben is a stresszhatás következményeinek mérséklését elősegítő változások következnek be. A transzkripció szintű változások különböző jelátviteli utak által befolyásolt transzkripciós faktorok hatásaként következnek be. Hatásukra fokozott mértékben íródhatnak át

stresszfehérjék, a stresszválaszban szerepet játszó hormonok, illetve egyéb védő molekulák bioszintézis enzimrendszerének elemei, illetve további transzkripciós faktorok génjei is.

A molekuláris biológia módszereivel legbehatóbban jellemzett modellnövényben, az *Arabidopsis thaliana* -ban az abiotikus stressz tolerancia kialakításában és a stresszválaszban szerepet játszó proteinek két fő csoportra: funkcionális és szabályozó fehérjékre oszthatók (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 2007). A közvetlen funkcióval rendelkező fehérjék csoportjába sorolhatók a vízcatorna fehérjék, bizonyos transzporterek, a detoxifikációban részt vevő enzimek, a makromolekulákat védő faktorok (LEA fehérjék, chaperonok), ozmolitok (prolin, cukrok) bioszintézisének kulcsenzimek valamint bizonyos proteázok. A szabályozó szereppel rendelkező fehérjék közé sorolhatók a transzkripciós faktorok, a protein kinázok illetve foszfatázok, a foszfolipid metabolizmus fehérjéi, valamint a szárazságtoleranciában fontos szereppel rendelkező növényi hormon, az abszcizinsav bioszintézisének enzimek.

3.4. Az EcoTILLING módszer szerepe a genetikai variabilitás feltárásában

Napjainkban kiterjedt kutatás folyamányaként látnak napvilágot olyan eredmények, melyek bizonyos gének szárazságtűrésben betöltött szerepét valószínűsítik. A helyzetet azonban nehezíti a vizsgált faj egyedei, genotípusai között fennálló genetikai variabilitás, mely az egy adott lókuszból megtalálható különböző allélvariánsok jelenlétéből adódik.

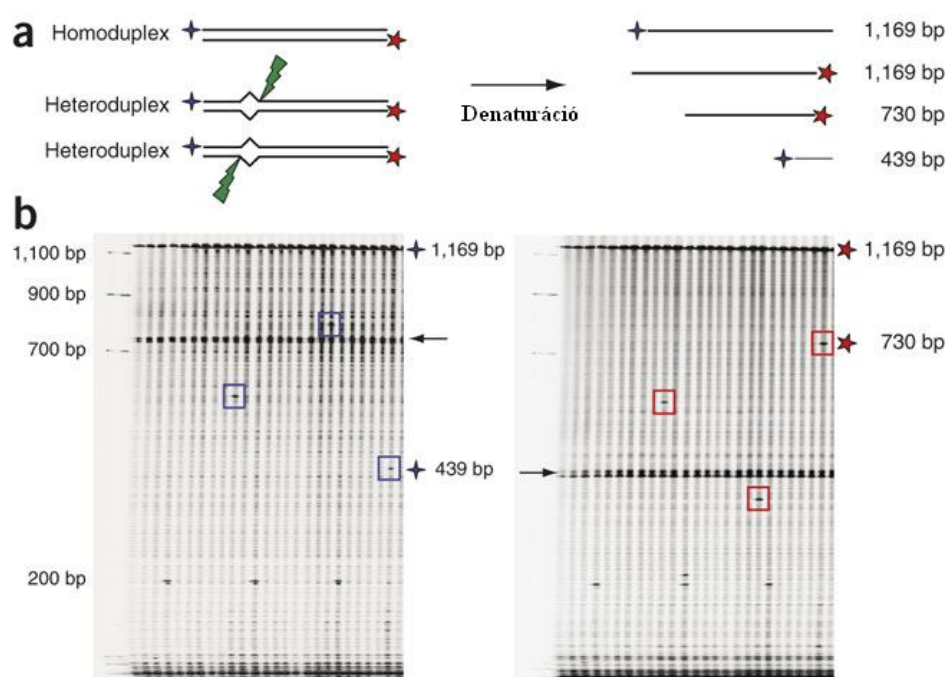
A közelmúltban különböző megközelítéseket alkalmazó genetikai analízisek irányultak a gabonafélék, közöttük az árpa szárazságtoleranciájának kialakításában résztvevő genetikai faktorok azonosítására illetve részletes vizsgálatára (Guo és mtsai. 2009, Talamè és mtsai. 2007, Marzin és mtsai. 2008). Ezen vizsgálati módszerek (Pl: QTL analízis, gén expressziós vizsgálatok, transzgénikus vizsgálati módszerek) eredményei alapján többféle gén illetve géntermék szárazságtoleranciában betöltött szerepe valószínűsíthető. Azonban a nagy hatékonyságú módszerek alkalmazásával feltárt génjelöltek stressztoleranciában betöltött valószínűsített funkciója - részben a szárazságtűrés kvantitatív voltából fakadóan - csak kevés esetben igazolható egyértelműen.

További akadályt képez a talált gének szárazságtűrésben betöltött szerepének pontos megismerése előtt, hogy az általánosan használt vizsgálati módszerek gyakran nem terjednek ki a gének allélikus variabilitásának megismerésére. Ennek oka elsősorban az ilyen vizsgálatok magas költség- és időigényében keresendő.

Annak érdekében, hogy a szerzett ismeretek között el tudjunk igazodni, illetve tovább tudjunk lépni a szárazságtűrés, mint kvantitatív jelleg kialakításában résztvevő gének pontos funkciójának tisztázásában; elengedhetetlenül szükséges a gének és allévariánsaik szárazságtoleranciában betöltött szerepének megismerése. Erre a feladatra kínál lehetőséget az EcoTILLING technológia.

Az EcoTILLING (Comai és mtsai. 2004) módszer a TILLING technológia természetes populációk genom diverzitásának feltárására alkalmazott változata.

A TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes, Colbert és mtsai. 2001) módszer kémiai mutagenézisre épül, mellyel nagyszámú egyedben, számos mutációt idéznek elő. A különböző egyedekben keletkezett eltérő mutációkat nagy áteresztő képességű módszerrel detektálják, mely bizonyos PCR lépéseken, heteroduplex képzésen és a szekvencia eltérések nukleázokkal történő emésztésén alapul (4. ábra).



4. ábra: **a:** A heteroduplex molekulák mismatch pozícióiban egyszálú DNS specifikus endonukleázokkal végzett enzimatis emésztés sematikus rajza. **b:** az általánosan használt különböző fluoreszcens festékekkel jelölt molekula fragmentumok kimutatása és méret szerinti elkülönítése (Till és mtsai. 2006/1).

Az EcoTILLING egy nagy áteresztőképességű, költségkímélő technológia, amely alkalmas a természetes populációkban jelenlévő polimorfizmusok hatékony feltárására. A

technológia egyaránt lehetővé teszi a polimorfizmusok megtalálását és a haplotípusok elkülönítését az egyedi allélvariánsok szekvenciájának meghatározása útján.

Az EcoTILLING technológia kiválóan alkalmas a természetes populációk genetikai diverzitásának gyors és költséghatékony módon történő feltárására. Segítségével a vizsgált populáció adott génszakaszaiban meglévő valamennyi polimorfizmus kimutatható; számuk, típusuk és elhelyezkedésük is pontosan meghatározható. A módszer használatával inszerciók/deléciók (InDel), valamint egyetlen bázispárnai eltérések (SNP = Single Nucleotide Polymorphism) is kimutathatók a vizsgált populáció egyes tagjai között.

A módszert, széleskörű felhasználhatóságának köszönhetően számos célra alkalmazzák. Humán gyógyászati jelentősége elsősorban az öröklődő genetikai eltéréseket hordozó allélvariánsok azonosításában keresendő (Till és mtsai. 2006/2).

Yu és mtsai. (2012) EcoTILLING módszerrel rizsben 24 transzkripció faktor család promóter szekvenciájának allélikus variabilitását tárták fel, melynek során sikerült több esetben asszociációs kapcsolatot kimutatni a vizsgálatba vont genotípusok szárazságtoleranciájával összefüggésben.

Az EcoTILLING módszert árpa vonalakban Mejlhede és mtsai. (2006) alkalmazták liztharmat rezisztencia gének (mlo és Mla) allélikus variabilitásának feltárására. Lababidi és mtsai. (2009) indukált mutagenézissel előidézett misszensz mutációkat mutattak ki 2 dehidrin génben a TILLING módszer segítségével közel 10 000 mutáns árpa vonal vizsgálatával. Xia és mtsai. (2012) a klorofil A/B kötő fehérjét kódoló Lhcb1 gén EcoTILLING analízissel kimutatott allélikus variabilitása és az árpa 6 agronómiai tulajdonsága (növénymagasság, kaláshossz, kalásonkénti szemszám, ezerszemsúly, zászlóslevél terület és szín) között találtak korrelációt .

3.5. Az árpa biológia jellemzése

Régészeti bizonyítékok utalnak arra, hogy az árpát már a kőkorszaktól kezdődően termesztették. A növényfaj termesztése, fogyasztása és felhasználása az emberi kultúra bölcsőjéből, Elő-Ázsiából kiindulva közel 10 000 év alatt az egész világon elterjedt.

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) a fűfélék (*Poaceae*) családjába, azon belül pedig *Triticeae* tribusba tartozik, több más fontos termesztett gabonafélével együtt (Pl: búza, rozs). A termesztett árpa mellett a rendkívüli alakgazdagságú *Hordeum* nemzetségbe 16 vad árpafaj tartozik. A mai termesztett árpafajták őseinek a *Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum*-ot

tekintik. Ez a vad kétsoros árpafaj a Közel-Keleten, elsősorban a mai Törökország területén napjainkban, természetes körülmények között is megtalálható. Az egynyári, füre emlékeztető növény jellegzetessége a teljes érésben széthulló kétsoros kalászsorsó.

Termesztési területét tekintve a világon a negyedik legelterjedtebb gabonaféle, közel 100 millió hektáron termesztik. Legjelentősebb kenyér és takarmány gabonaként történő felhasználása mellett a söriparban a malátagyártás fontos alapanyaga, illetve a reformtáplálkozás előtérbe kerülésével közvetlen fogyasztása is egyre fontosabb szerepet kap (Pl: árpagyöngy, árpafű). Hazánkban a magasabb termőképességgel és termésstabilitással rendelkező őszi árpa elsősorban takarmányként kerül felhasználásra. A tavaszi árpa fajtákat főként a söripar hasznosítja, de takarmányként valamint élelmiszer-alapanyagként is szolgál, emiatt jelentősége folyamatosan növekszik.

Rendszertani szempontból a kalászban lévő termékenyült kalászkák száma alapján megkülönböztetünk kétsoros valamint többsoros árpákat, utóbbiak közül elsősorban a 6 sorosak terjedtek el. Egyvirágú, öntermékenyülő kalászkái hármásával ülnek a kalászsorsó padkáin. A hatsoros árpa padkáin mind a három, míg a kétsoros árpa esetében csupán egy virág termékenyül meg.

Fontos gazdasági jelentősége mellett a szárazság tolerancia genetikai hátterében meghúzódó genetikai faktorok megismerését célzó kutatások fontos modellnövénye az árpa (*Hordeum vulgare* L.), melynek okai elsősorban a növény alábbi tulajdonságaiban keresendők:

- Az árpa a hazánkat és a világot tekintve is komoly gazdasági jelentőséggel bír. A söripari és a takarmányozási célra történő felhasználása mellett fontos kenyérgabonaként is szolgál. Jelentősége napjainkban tovább növekszik.
- Az 5 kontinensre kiterjedő termesztési területe számos helyen a szárazságstressznek nagymértékben kitett, erősen vízhiányos területekre is benyúlik. Ezt rendkívüli alakgazdagsága teszi lehetővé, amely a nagymértékű genetikai változatosságán alapszik.
- Ebből fakadóan túlzás nélkül állíthatjuk, hogy az árpa génkészletében szinte kimeríthetetlen genetikai potenciál rejlik, mely közvetlenül felhasználható a szárazság tolerancia genetikai módszerekkel történő javítását célzó kutatások során.
- Emellett az árpa genetikai módszerekkel viszonylag egyszerűen vizsgálható diploid genommal rendelkezik, szemben olyan más gabona fajokkal, mint például a búza,

melynek hexaploid kromoszómakészlete ráadásul homeológiát mutat az árpa 7 kromoszómájával.

- Ennek következtében az árpa genetikai analízise nyomán születő eredmények több, a világ élelmiszerellátásában külön-külön is kiemelt jelentőséggel bíró gabonaféle termesztési tulajdonságainak javításához is hozzájárulhatnak.
- Nagy felbontású, cDNS-ek illetve SNP-k felhasználásával készített genetikai térképek állnak rendelkezésre (Aghnoum és mtsai. 2010; von Korff és mtsai. 2008).
- Folyamatosan nő a genom szekvenálási programoknak köszönhetően a szekvencia adatbázisok használhatósága (Vogel és mtsai. 2010).
- A mutáns gyűjtemények felhasználása széleskörű (Gottwald és mtsai. 2009).
- A génbeépítés, a genetikai transzformáció módszerei hatékonyan alkalmazhatók árpában (Shrawat és mtsai. 2006).

3.6. Az árpa szárazságtűrése

Az árpa genotípusok között számos olyan található, amely a különböző stressz hatásokkal szemben általános értelemben véve, hasonló gabonafélékkel összevetve alapvetően toleránsnak tekinthető. Ezen kívül a különböző környezeti feltételekhez való alkalmazkodó képessége is kiemelkedő a termesztett gabonafélék közül. Az egyes genotípusok között azonban jelentős eltérések tapasztalhatók a stressztolerancia tekintetében. Ez a variabilitás elsősorban a faj kiterjedt, a legkülönbözőbb éghajlatú és mikroklímájú területeket magában foglaló termesztési zónájának tulajdonítható.

A szárazságtűrés az árpa esetében is rendkívül komplex és kvantitatív jelleg, azaz kialakításában számos gén, eltérő arányban megnyilvánuló hatása additív módon érvényesül. Az árpa a molekuláris genetikai kutatásokban kiemelt szereppel rendelkezik, mely egyrészt gazdasági jelentőségéből, másrészt modellként való használatából fakad.

A szárazság toleranciában szerepet játszó kromoszómális régiók meghatározásához gyakran eltérő toleranciájú vonalak keresztezéséből származó RIL (recombinant inbred line) populációkat használnak. A komplex jelleg kialakításában résztvevő QTL (Quantitative Trait Loci) lókuszok elhelyezkedését a fenotípusos paraméterek statisztikai elemzésével határozzák meg.

Szárazságtűréssel kapcsolatos tulajdonságok vizsgálata során számos gént illetve QTL régiót azonosítottak már árpában (Langridge et al. 2006). Az azonosított QTL-ek lefedik a genom közel 50 %-át, e régiók a kromoszómákon gyakran QTL klaszterekbe tömörülnek.

A magasabb termőképességgel rendelkező ER/Apm és a kedvező szárazságtoleranciával rendelkező Tadmor genotípusok keresztezéséből származó rekombináns beltenyésztett populáció vizsgálata útján von Korff és mtsai. (2008) nagyszabású kísérletben 14 agronómiai paramétert vizsgáltak mediterrán, száraz termőhelyi adottságok mellett 16 különböző környezeti feltétel között. Számos QTL régió hatását vizsgálták markerek segítségével.

A stressztolerancia szempontjából szenzitívnek tekinthető ER/Apm genotípusból származó allélek szárazságtűrésben megnyilvánuló additív hatását a kapcsolt markerek segítségével a magasabb termésszintet lehetővé tevő termőhelyi adottságok mellett is ki tudták mutatni, míg a toleráns, de alacsonyabb termőképességű Tadmor genotípusból származó allélek hatása kizárólag a magasabb stressz szintű kísérleti körülmények között mutatkozott meg. Tehát a termőképességet befolyásoló genetikai faktorok hatása már kisebb vízmegvonás mellett is érvényesül, míg a szoros értelemben vett szárazságtoleranciát kialakító régiók elsősorban erősebb stresszhatások esetén kerülnek előtérbe.

Az árpa szárazságtoleranciájának kialakításában is kiemelkedően fontos szerep jut a sztómákon keresztül lezajló gázcseré szabályozásának. A termésképzés időtartama alatt előidézett vízmegvonás esetén szignifikáns összefüggés mutatható ki a termés mennyiség és a sztómák konduktanciája között (González és mtsai. 1999).

Az utóbbi időben a terméseredmények fokozását elsődleges célul kitűző árpanemesítés világszerte a felhasznált genetikai háttér szűküléséhez vezetett (Worch és mtsai. 2011). Ugyanakkor a rendkívül alakgazdagságot és genetikai változatosságot mutató árpa esetében számos lehetőség mutatkozik új genetikai források (tájfalták, vad változatok, GM genotípusok) bevonására.

Új, kedvezőbb tulajdonságot hordozó allélvariánsok használatának különösen a szárazságtűrés fokozásában lehet jelentős szerepe, hiszen a világ számos pontján szárazságnak jelentős mértékben kitett területeken folyik árpatermesztés, illetve a körülményekhez igazodó fajta előállítás. Így ezen genotípusokban igen nagy, és jelentős részben még kihasználatlan genetikai potenciál rejlik.

3.7. Az árpa és más gabonafélék vízhiány elleni védekezésének lehetőségei

A gazdasági és élelmezési szempontból a világ legjelentősebb haszonnövényei termőterületének jelentős része szárazság stressznek különböző mértékben; időszakosan vagy állandóan kitett területen található.

Hazánk esetében a kontinentális éghajlat következményeként jelentős évjáratfüggő csapadék eloszlásbeli különbségek mutathatók ki. Ezt, a termésstabilitás szempontjából eleve kedvezőtlen hatást az utóbbi években felerősíteni látszik az általában a globális klíma átalakulásnak tulajdonított szélsőséges időjárási tényezők, amelyek világszerte éreztetik hatásukat (Deikman és mtsai. 2011).

A fenti okokból következően napjaink legnagyobb tudományos kihívásai közé tartozik olyan növények előállítása, melyek e tekintetben fokozott mértékű ellenállósággal rendelkeznek. A világ erősen kontinentális vagy félsivatagos éghajlatú vidékein a kifejezetten szárazságtűrő növényfajták nemesítése a cél, míg hazánk egyre változékonyabbá váló éghajlatán olyan magas terméspotenciálú genotípusok nemesítése indokolt, amelyek vízhiányra a lehető legkisebb termés kieséssel reagálnak.

A világ gabonatermő területeinek többségén földrajzi okok vagy gazdaságossági megfontolások miatt nincs lehetőség a vízhiány mesterséges öntözéssel történő enyhítésére. Ebből következően a klímaváltozás miatt egyre hektikusabbá váló időjárástól függő csapadékelátottságot tekinthetjük olyan adottságnak, melyet széleskörűen nem áll módunkban közvetlenül befolyásolni. Ennek értelmében magasabb hozamok a nem öntözhető területeken kizárólag a talaj vízkészletének magasabb hatásfokú hasznosításával érhetők el.

Ezen cél megvalósulhat a talaj meglévő vízkészletének agrotechnikai eszközökkel történő megőrzése útján. A szárazságstressz elleni védekezés történhet többek között vízkímélő talajművelési technológiák, korábbi vetésidő, alacsonyabb töszám alkalmazásával vagy a vetésforgó módosítása útján.

A másik fő irányvonal olyan fajták nemesítése, melyek kedvezőbb fiziológiai paramétereik folytán vízhiányos körülmények között is versenyképes termésmennyiséget képesek előállítani. Ennek egyik lehetősége a rövidebb tenyészidejű fajták alkalmazása, melyek nagyobb eséllyel képesek rövidebb életciklusukkal elkerülni a legszárazabb periódust. Ez a nemesítési irányvonal azonban rendszerint kompromisszumhoz vezet a termőképességet illetően.

Az új, a rendelkezésre álló vízkészletet jobban hasznosító, a szárazsággal szemben fokozottabb ellenállóságot mutató fajták létrehozása rendkívül komplex feladat. Érdemes

azonban az általános stressztűrő képességen túl néhány fontos tulajdonságot kiemelni, melyek figyelembevételre, illetve a pontos időbeni monitorozása fontos szerepet tölthet be a vízkészletekkel való takarékosabb gazdálkodásban.

A szárazságtolerancia szempontjából alapvető jelentőségű a rendelkezésre álló vízkészlet hatékony felhasználása. A vízhasznosítási hatékonyság (WUE = Water use efficiency) az egységnyi szárazanyag létrehozásához szükséges vízmennyiséget jelenti. Javításával önmagában is növelhető a biomassza produkció optimális körülmények és vízhiány esetén is (Condon és mtsai. 2004).

Mivel azonban a gyakorlatban csupán valamely növényi rész (Pl. szemtermés) rendelkezik gazdasági értékkel, ezért a rendelkezésre álló vízmennyiség hatékony felhasználása mellett kiemelt jelentőséggel bír az egyes növényi szervek egymáshoz viszonyított aránya is. A harvest index (HI) a szemtermés és a föld feletti részek tömegének hányadosaként írható le. Növelése eredményeként emelhető a termés biomassza produkción belüli részaránya, így a rendelkezésre álló víz- és tápanyagkészlet magasabb hányada fordítódik a termésképzésre.

3.8. Az árpa szárazságtűrésében szerepet játszó faktorok, génjelöltek

A génjelölteket expressziós mintázatok, 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 pleiotróp hatással rendelkezhetnek (Forster mtsai. 2000). Ezen szempontok alapján eddig az alábbi géneket vontuk vizsgálatba.

A szárazság stressz elleni tolerancia kialakításban fontos szerep tulajdonítható a *HvA1* (*Hordeum vulgare* L. *HvA1*) génnek, amely egy LEA fehérjét kódol. Szerepét különböző stresszhatások, közöttük vízhiány esetén is kimutatták több gabonafélében (búzában és rizsben) is (Sivamani és mtsai. 2000; Rohila és mtsai. 2002). Az árpa szárazságtűrésében betöltött funkciójára transzgenikus vizsgálatok (Bahieldin és mtsai. 2005) adatai, illetve szárazság stressz körülmények között végzett QTL analízis eredményei (von Korff és mtsai. 2008) egyaránt utalnak. A LEA fehérjecsaládba tartozó termésérésben szerepet játszó dehidrin gének emelkedett expresszióját mutatták ki szárazságstressz alatt és más stresszhatások következményeként is (Close 1997; Choi és mtsai. 1999). Több ilyen gént azonosítottak és jellemeztek már árpában (Park és mtsai. 2006; Rodriguez és mtsai. 2005).

A **HvSRG6** (*Hordeum vulgare* L. stress responsive gene protein 6) gént Malatrasai és mtsai. (2002) azonosították árpaiban. Szárazságstressz alatt, illetve abszcizinsavval történő kezelés hatására emelkedett expresszióját mutatták ki árpa csíranövényekben. A gént az árpa 7H kromoszómájának azon részére térképezték, amely régióban található gének szerepet játszanak az ozmotikus stresztolerancia kialakításában.

A **HvNHX1** (*Hordeum vulgare* L. mRNA for sodium/proton antiporter) és a **HvPI** (*Hordeum vulgare* L. mRNA for vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase) gének ozmotikus stresszhatások esetén a homeosztázis fenntartásában játszanak szerepet (Shi és mtsai. 2002; Gaxiola és mtsai. 2001). Árpában végzett ozmotikus stressz kísérletekben kimutatták mindkét gén transzkripciójának megemelkedését (Fukuda és mtsai. 2004). A búzából átvitt *TNXX1* és *TVPI* gének *Arabidopsis*-ban túlexpresszáltatott termékei a növény szárazság és magas sókoncentráció okozta stresszhatásokkal szembeni ellenállóképességének fokozódásához vezettek (Brini és mtsai. 2007).

A **HvARH1** (*Hordeum vulgare* L. gene for aldose reductase) gén terméke, az aldóz reduktáz enzim a különböző jellegű stressz hatások (Pl: kémiai, szárazság) eredményeként bekövetkező lipid peroxidációtól védi a sejteket a keletkező reaktív gyökök semlegesítése útján (Bartels 2001, Oberschall és mtsai. 2000). Ennél fogva a vízhiány esetén az oxidatív stresztolerancia kialakításában is fontos szerepe van. A *HvARH1* gén árpa szárazságstressz toleranciájában betöltött szerepét Bartels és mtsai. (1991) bizonyították elsőként, kimutatva az aldóz reduktáz enzim emelkedett jelenlétét deszikkáció esetén.

A **HvDREB1** (*Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare* dehydration responsive element binding protein 1) gén egy, a szárazságtűrés kialakításában fontos szereppel rendelkező transzkripciós faktort kódol. Emelkedett génexpressziós szintjét kimutatták szárazságstressz, magas sókoncentráció és alacsony hőmérséklet által kiváltott stresszhatások esetén egyaránt (Xu és mtsai. 2009). Túltermeltetése *Arabidopsis* növényekben fokozott stresszel szembeni ellenállóságot eredményezett magas sókoncentrációk esetén.

HvDRF1 (*Hordeum vulgare* L. dehydration-responsive factor-1) gén terméke az ERF/AP2 család CBF (C-repeat binding factor)/DREB (Dehydration-responsive element-binding factor) alszaládájába tartozik (Taketa és mtsai. 2008). Kimutatták a *HvA1* gén transzkripciójára gyakorolt aktivátor hatását (Xue és Lovridge 2004).

4. Célkitűzés

1. Kutatásaink elsődleges célja a szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek természetes variabilitásának feltárása volt az EcoTILLING módszerrel egy szárazságtűrés szempontjából nagy genetikai variabilitást mutató, 96 genotípust tartalmazó árpa populációban.

2. A legfontosabbnak ítélt, teljes hosszukban vizsgált génjelöltek allélvariánsainak egyértelmű elkülönítésére alkalmas könnyen detektálható markerkészlet létrehozása. A markerkombinációk kiválasztásánál arra kívántunk törekedni, hogy a genetikai markerek segítségével azokat a haplotípusokat is el tudjuk különíteni, amelyek aminosav szinten is különbséget mutatnak.

3. A kifejlesztett markerkombinációk használhatóságának igazolása a későbbi nemesítési alkalmazásuk elősegítése céljából. Ennek érdekében el kívántuk végezni a teljes árpa genotípus kollekció ismételt genotipizálását a kifejlesztett allél specifikus markerkombinációk segítségével.

4. A genetikailag vizsgált árpa kollekció részét képező, 23 genotíusból álló törzskollekció szárazságtűréssel kapcsolatos fenotípusos paramétereinek széleskörű jellemzése kontroll és stressz kondíciók mellett pontosan kontrollált, üvegházi körülmények között, a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer alkalmazása útján.

5. Az egyes fiziológiai és agronómiai paraméterek között esetlegesen fennálló korrelációk feltárása, illetve szárazság stressz hatása nyomán jelentkező eltérések statisztikai elemzése a termőképesség, illetve a stressz tűrés javításának lehetőségeit kutatva.

5. Anyagok és módszerek

5.1. EcoTILLING analízis

EcoTILLING módszer az alábbi főbb lépéseket foglalja magában:

(1.) Az EcoTILLING technológia első eleme egy kétlépéses PCR-reakció. A templátul szolgáló DNS törzsoldatok koncentrációjának kiegyenlítése után valamennyihez ekvimoláris mennyiségben keverünk egy, általunk referenciának választott DNS-ből. Ez után következik a célrégiót is magában foglaló génszakasz amplifikációja PCR reakció segítségével olyan módon, hogy a termék méret lehetőleg ~500 bp és ~1500 bp közötti mérettartományba essen az eredmények optimális kiértékelhetősége érdekében. Az ennél hosszabb génszakaszok átfedő amplikonok segítségével vizsgálhatók. Annak érdekében, hogy a keletkezett fragmentumokat később detektálni lehessen, fluoreszcensen jelölt nukleotidokat építenek a termékbe. Az amplifikáció során alkalmazott primerek is jelölhetők különböző karakterű fluoreszcens molekulákkal, ezáltal az egyes fragmentumok később megkülönböztethetővé válnak.

(2.) A reakció második eleme a heteroduplex képzés, mely egy melegítést követő fokozatosan történő lehűtést jelent, melynek eredményeként heteroduplex molekulák képződnek a vizsgált és a referenciaként szolgáló DNS megfelelő szakaszainak összekapcsolódása nyomán.

(3.) A keletkezett DNS szál enzimatis hasítása a keletkezett heteroduplex molekulákban meglévő nukleotid polimorfizmusok jelenléte miatt kialakuló mismatch pozíciókban. Erre a célra, az egyszálú DNS-re specifikus aktivitással rendelkező enzimek használhatók (PL: Cell-es és Endo1-es endonukleáz enzimek).

(4.) A keletkezett fragmentumok molekula méret szerinti elkülönítése, és a termékek fluoreszcens jelének detektálása. Ez a vizsgálat magas felbontású gél bázisú, vagy kapilláris szekvenáló készüléken végezhető.

(5.) A vizsgált populáció egyes genotípusainak haplotípus kategóriákba történő besorolása a keletkezett gélekép kiértékelési keretében található hasított fragmentumok által létrehozott mintázat vizuális kiértékelése útján.

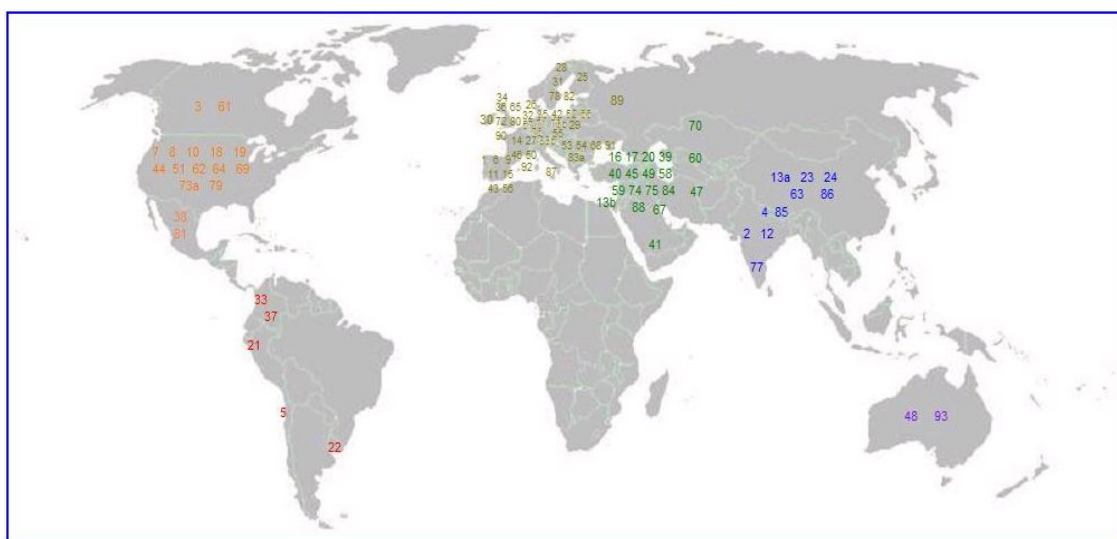
(6.) Haplotípus kategóriánként egy-egy reprezentáns ismételt amplifikációja, majd mindkét (forward és reverz) irányból történő megszekvenálása.

(7.) A kapott szekvenciák többszörös illesztése útján a polimorfizmusok helyének és jellegének meghatározása.

5.1.1. Az EcoTILLING analízishez használt árpa genotípus kollekció összeállítása

Az EcoTILLING analízishez első lépésként egy 96 genotípust tartalmazó, szárazságtűrés szempontjából variábilis árpa kollekciót állítottunk össze. A világ számos pontjáról gyűjtöttünk olyan genotípusokat, melyek az irodalmi adatok, illetve adatbanki információk alapján szárazságtűrőnek vagy éppen szenzitívnek tekinthetők (6. ábra). A köztermesztésben lévő fajták mellett génbankokban megtalálható termesztett fajtákat, ökotípusokat és vad változatokat is vizsgálatba vontunk.

A kollekciót alkotó 96 árpa genotípus közül 20 genotípust az European Barley Database (Knüpfner, 1988) adatbankban található szárazságtűrésre vonatkozó adatok alapján választottunk ki. A Spanish Barley Core Collection (Igartua et al. 1998) génbankból további 7, szárazság stressz esetén is magas termést nyújtó genotípust szereztünk be. Ezen kívül 5 köztermesztésben lévő, magas terméspotenciállal rendelkező árpa fajtát is beillesztettünk a kollekcióba. További 11 olyan genotípust vontunk vizsgálatba, melyek az árpa stressz tűréssel foglalkozó szakirodalom szerint szárazságtűrőnek tekinthetők. A fennmaradó 53 genotípust tartalmazó árpa genotípus gyűjteményt Nils Stein (IPK, Gatersleben) bocsátotta a rendelkezésünkre. Ezt a kollekciót korábban a mi szempontjainkhoz hasonló megfontolások alapján, a szárazságtűrés és a földrajzi származás szempontjából variábilis módon állította össze a német partner.



6. ábra: A genotípusok földrajzi eredete.

Ezek a variánsok különböző földrajzi helyről származnak, ennél fogva szárazságtűrés szempontjából nagyfokú variabilitást képviselnek. Az EcoTILLING vizsgálatba vont árpa genotípusok származását a 6. ábra tartalmazza. A kollekció összeállításánál arra törekedtünk, hogy a világ valamennyi jelentős árpa termőterülete reprezentálva legyen. Mivel a tavaszi árpa fajta világviszonylatban, főként a szárazságnak kitett termőterületeken számszerű fölényben vannak az őszi árpákhoz képest ezért a genotípus kollekcióba is több tavaszi fajta került.

Az EcoTILLING analízist technikai okokból eredően 92 genotípus bevonásával hajtottuk végre; így az eredeti kollekcióból az alábbi 4 genotípust hagytuk ki: #13b-ISR42-8, #73b-SCA239, #83b-SCA118, #93-Keel. A vizsgálatba vont genotípusok felsorolását és legfontosabb tulajdonságait az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: Árpa genotípus kollekció

Sor-szám	Név	Adatbanki azonosító	Származási hely (ország)	Származási hely (régió)	Növekedési típus	Soros-ság	Beszerezési forrás	Szárazságtűrési információ
#1	Albacete	AUS 400244	ESP	EU	Ó	6	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#2	BCC532	BCC 532	IND	K-Á	T	6	N.S.	-
#3	Keystone	BCC 888	CAN	É-AM	T	6	N.S.	-
#4	BCC732	BCC 732	NPL	K-Á	T	6	N.S.	-
#5	Libra	BCC 899	CHL	D-AM	T	2	N.S.	-
#6	Zaida	SBCC175	ESP	EU	T	2	SBCC	Termés szárazság esetén: nagyon alacsony (AB)
#7	AZ8501	PI 499692	USA	É-AM	Ó	6	BGR001	Szárazságtűrő (AB)
#8	Hazen	BCC 875	USA	É-AM	T	6	N.S.	-
#9	Almunia	SBCC162	ESP	EU	Ó	6	SBCC	Termés szárazság esetén: magas (AB)
#10	Kombyne	BCC 893	USA	É-AM	T	6	N.S.	-
#11	Alpha	SBCC168	ESP	EU	Ó	2	SBCC	Termés szárazság esetén: alacsony (AB)
#12	BCC526	BCC 526	IND	K-Á	T	6	N.S.	-
#13a	Hexagonal	IG 38224	CHN	K-Á	Ó	6	SYR002	Szárazságtűrő (AB)
#13b	ISR42-8	-	ISR	Ny-Á	T	6	M.K.	Szárazság- és hőstressz toleráns (Mohammed és mtsai. 2004)
#14	Barberousse	SBCC163	FRA	EU	Ó	6	SBCC	Termés szárazság esetén: közepes (AB)
#15	Almunia	SBCC162	ESP	EU	Ó	6	SBCC	Termés szárazság esetén: magas (AB)
#16	BCC192	BCC 192	SYR	Ny-Á	T	2	N.S.	-
#17	Arabi Aswad	JIC 20126	SYR	Ny-Á	T	2	GBR011	Szárazságtűrő (Ceccarelli és Grandó 2001)
#18	Otis	BCC 913	USA	É-AM	T	2	N.S.	Szárazságtűrő (AB)
#19	Prilar	IG 17507	USA	É-AM	T	6	SYR002	Szárazságtűrő (AB)
#20	BCC195	BCC 195	SYR	Ny-Á	T	2	N.S.	-
#21	Sacasco 1	BCC 927	PER	D-AM	T	6	N.S.	-
#22	FNC 1	BCC 860	URY	AM	T	2	N.S.	-
#23	Chilga Arpa	IG 24765	CHN	K-Á	Ó	6	SYR002	Szárazságtűrő (AB)
#24	Hex. Wh. Barley	HOR 12305	CHN	K-Á	Ó	6	DEU146	Szárazságtűrő (AB)
#25	Pomo	BCC 1450	FIN	EU	T	6	N.S.	-
#26	Tyra	BCC 1418	DNK	EU	T	2	N.S.	-

Sor-szám	Név	Adatbanki azonosító	Származási hely (ország)	Származási hely (régió)	Növekedési típus	Soros-ság	Beszerzési forrás	Szárazságtűrési információ
#27	Plaisant	-	FRA	EU	Ő	6	CRC	Szárazság érzékeny (Volaire és mtsai. 2003)
#28	Mette	BCC 1396	SWE	EU	T	2	N.S.	-
#29	Gryf	BCC 1385	POL	EU	T	2	N.S.	-
#30	Hunter	BCC 1389	IRL	EU	T	2	N.S.	-
#31	Tellus	BCC 1416	SWE	EU	T	2	N.S.	-
#32	Varunda	BCC 1422	NLD	EU	T	2	N.S.	-
#33	Quiben-ras	BCC 921	COL	AM	T	6	N.S.	-
#34	Blenheim	BCC 1373	GBR	EU	T	2	N.S.	-
#35	Grit	BCC 1384	DEU	EU	T	2	N.S.	-
#36	Golf	BCC 1383	GBR	EU	T	2	N.S.	-
#37	Chia	BCC844	COL	D-AM	T	6	N.S.	-
#38	CMSWB77A-0115..	AUS 490153	MEX	É-AM	Ő	6	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#39	RBYT-HA 89-90..	AUS 406893	SYR	Ny-Á	Ő	2	AUS003	-
#40	ICB78-0671-10AP..	AUS 490165	SYR	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#41	ER/APM	AUS 407462	UNK	Ny-Á	T	2	AUS003	Száraz viszonyokhoz jól alkalmazkodik (Diab és mtsai. 2004)
#42	Perun	BCC 1403	DEU	EU	T	2	N.S.	-
#43	CEBADA	SBCC27	SPA	EU	Ő	6	SBCC	Termés szárazság esetén: nagyon magas (AB)
#44	PRIMUS	BG-024389	USA	É-AM	T	6	BGR001	Szárazságtűrő (AB)
#45	ICB77-0169-1AP..	AUS 490146	SYR	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#46	Natasha	BCC 1400	FRA	EU	T	2	N.S.	-
#47	TOKAK 157/37	AUS 404863	UNK	Ny-Á	Ő	2	AUS003	Szárazságtűrő (Altinkut és mtsai. 2001)
#48	WI2291	AUS 490150	AUS	AU	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#49	ICB78-0614-4AP..	AUS 490155	SYR	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#50	Volga	BCC 1423	FRA	EU	T	2	N.S.	-
#51	SECO	PI 508552	USA	É-AM	T	6	BGR001	Szárazságtűrő (AB)
#52	Salome	BCC 1411	DEU	EU	T	2	N.S.	-
#53	GK Rezi	-	HUN	EU	Ő	6	CRC	Hazánkban köztermesztésben lévő fajta
#54	MK 42	BCC 1398	HUN	EU	T	2	N.S.	-
#55	Spartan	BCC 1414	CZE	EU	T	2	N.S.	-
#56	Monlón	SBCC166	SPA	EU	T	6	SBCC	Termés szárazság esetén: magas (AB)
#57	Menuet	BCC1395	NLD	EU	T	2	N.S.	-
#58	ICB79-0583-2AP..	AUS 490154	SYR	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#59	RIBANE-03	AUS 406450	SYR	Ny-Á	T	6	AUS003	Korábbi standard fajta
#60	ARTA	AUS 405831	UNK	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (Rong-hua és mtsai. 2006)
#61	Diamond	BCC 852	CAN	É-AM	T	6	N.S.	-
#62	Unitan	BCC 942	USA	É-AM	T	6	N.S.	-
#63	ZDM 8306	BCC 427	CHN	K-Á	T	2	N.S.	-
#64	Beecher	BCC 817	USA	É-AM	T	6	N.S.	-
#65	Georgie	BCC 1381	GBR	EU	T	2	N.S.	-
#66	Scarlett	-	-	EU	T	2	CRC	Hazánkban köztermesztésben lévő fajta
#67	BCC93	BCC 93	IRQ	Ny-Á	T	2	N.S.	-
#68	GK Sztár-omega	-	HUN	EU	Ő	2	CRC	Hazánkban köztermesztésben lévő fajta
#69	Atlas 68	BCC 814	USA	É-AM	T	6	N.S.	-
#70	Tadmor	AUS 490164	UNK	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#71	Sissy	BCC 1413	DEU	EU	T	2	N.S.	-
#72	Archer	BCC 1428	GBR	EU	T	2	N.S.	-
#73a	Compana	BCC 847	USA	É-AM	T	2	N.S.	Szárazságtűrő (AB)

Sor-szám	Név	Adatbanki azonosító	Származási hely (ország)	Származási hely (régió)	Növekedési típus	Soros-ság	Beszerzési forrás	Szárazságtűrési információ
#73b	SCA239	-	DEU	EU	T	2	M.K.	-
#74	ICB77-0091	AUS 490151	SYR	Ny-Á	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#75	RIHANE-01	AUS 403027	SYR	Ny-Á	T	2	AUS003	Standard fajta
#76	Apex	BCC 1367	DEU	EU	T	2	N.S.	-
#77	BCC527	BCC527	IND	K-Á	T	6	N.S.	-
#78	Sörle	BCC 1412	SWE	EU	T	2	N.S.	-
#79	Compana	HOR 3928	USA	É-AM	T	2	DEU146	Szárazságtűrő (AB)
#80	Claret	BCC 1378	GBR	EU	T	2	N.S.	-
#81	OLTE'S'	AUS 490148	MEX	É-AM	T	2	AUS003	Szárazságtűrő (AB)
#82	Nancy	BCC 1399	SWE	EU	T	2	N.S.	-
#83a	Novosadski 294	BCC 1541	JUG	EU	T	2	N.S.	-
#83b	SCA118	-	DEU	EU	T	2	M.K.	-
#84	Arabi Abiad	JIC 20125	SYR	Ny-Á	T	2	GBR011	Szárazságtűrő (Ceccarelli és Grandó 2001)
#85	BCC745	OUN630	NPL	K-Á	T	6	N.S.	-
#86	Fengtien Black	BCC 439	CHN	K-Á	T	6	N.S.	-
#87	ARDA	BCC 1303	ITA	EU	Ő	2	DEU146	Szárazságtűrő (Flagella és mtsai. 1998)
#88	BCC197	BCC 197	SYR	Ny-Á	T	2	N.S.	-
#89	Temp	BCC 1459	RUS	EU	T	2	N.S.	-
#90	Golden Promise	BCC 1382	GBR	EU	T	2	N.S.	-
#91	GK Habzó	-	HUN	EU	T	2	CRC	Hazánkban köztermesztésben lévő fajta
#92	KH Michka	-	FRA	EU	T	2	CRC	Hazánkban köztermesztésben lévő fajta
#93	Keel	-	AUS	AU	T	2	M.K.	Szárazságtűrő (Guide és mtsai. 2008)

A táblázatban szereplő rövidítések magyarázata:

Regió:

EU = Európa, É-AM = Észak-Amerika, D-AM=Dél-Amerika, Ny-Á = Nyugat Ázsia, K-Á = Kelet-Ázsia, AU = Ausztrália

Növekedési típus:

Ő = őszi, T = tavaszi

Beszerzési forrás:

-AUS0003 = Winter Cereals Collection, Agricultural Research Centre, Tamworth NSW 2340, Ausztrália
-BGR001 = Institute of Plant Introduction and Genetic Resources 'K. Malkov', Sadovo, District Plovdiv, Bulgária
-DEU146 = Institute of Plant Genetics and Crop Research, Gatersleben, Németország
-GBR011 = John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, Norfolk NR4 7UH, Egyesült Királyság
-SYR002 = Internat. Centre for Agricultural Research in Dry Areas, Aleppo, Szíria
-SBCC = Spanish Barley Core Collection, Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza, Spanyolország
-CRC = Cereal Research Non-Profit Company, Szeged, Magyarország
-N.S. = Nils Stein, Institute of Plant Genetics and Crop Research, Gatersleben, Németország
-M.K. = Maria von Korff, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Németország

Szárazságtűrési információ:

AB = adatbázisból származó információ

5.1.2. Genomiális DNS izolálás és minta előkészítés

Az EcoTILLING analízis egyik alapfeltétele, hogy a templátként szolgáló genomiális DNS nagy tisztaságban és kiváló minőségben álljon rendelkezésre. A genomiális DNS-t 10-14 napos árpa csíranövényekből izoláltuk. A mintákat (genotípusonként 50 mg növényi minta) folyékony nitrogénben történő fagyasztás után szövet homogenizáló készülék (Retsch Mixer MM 301, F. Kurt Retsch GmbH&Co. KG) segítségével tártuk fel 2x1 percen keresztül, 20/sec-os frekvencián. A minták felolvadása után 300 µl feltáró puffert adtunk a szövettörmelékhez melynek összetétele a következő volt: 240 µl EB (10mM Tris/pH 8,0, 500mM NaCl, 50 mM EDTA) puffer és 60 µl 10% SDS (w/v). A mintákat alapos keverés után 60°C-on, 60 percen át inkubáltuk, majd 4 °C-ra történő lehűtés után egy kicsapást végeztünk 4 °C-ra hűtött 3 M-os K-Acetát (pH: 4,8)-tal, amelyből 160 µl-t mértünk a mintákhoz, ezután 20 percre jégre helyeztük. A szövettörmelék és a csapadékot centrifugálással üleptítettük, majd elvégeztük a felülúszóból a DNS kicsapását 2x térfogatnyi 96 %-os etanol hozzáadásával. Újabb centrifugálás után a kapott pelletet 2 alkalommal mostuk 100 µl 70 %-os etanollal. Majd 20 perces 60 °C-on végzett szárítás után a pelletet 100 µl TE1 (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) pufferben oldottuk fel.

A mintákban szennyezésként jelenlévő RNS tartalom eltávolítása érdekében RN-áz kezelést végeztünk 10 mg/ml-es RN-áz oldatból 0,1 µl/minta mennyiség hozzáadásával. További tisztítási lépés során azonos térfogatnyi kloroform:izoamilalkohol (24:1) hozzáadása után 1 percig közepes intenzitással összeráztuk a mintákat, majd a szerves és vizes fázis szétválasztása érdekében lecentrifugáltuk a mintákat. A lepipettázott felülúszó DNS tartalmát 2x térfogatnyi etanollal csaptuk ki, majd kétszeri mosás következett 70 %-os etanol-víz eleggyel. Ezután a kapott DNS-eket ismét 60 °C-on 20 percen át szárítottuk, majd TE1 pufferben (vortexelés, 60 °C-os inkubálás 10 percig) oldottuk fel. A DNS törzsoldatokat TE1-es (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA) pufferben oldottuk vissza illetve tároltuk -20 °C-os hőmérsékleten a felhasználásig.

Az izolátumok minőségi és mennyiségi ellenőrzését 1,5 %-os agaróz gélen történő elektroforézissel, illetve spektrofotometriás úton végeztük NanoDrop 1000 spektrofotométer használatával. A törzsoldatok koncentrációjának kiegyenlítése (100 ng/µl) után valamennyihez ekvimoláris mennyiségben kevertünk egy, általunk referenciának választott DNS-ből, melyet a GK Rezi (#53) árpafajtából izoláltunk. A mintákból 1-1 µl-t használtunk fel templátként a PCR amplifikáció során.

5.1.3. PCR amplifikáció, fluoreszcens jelölés

Az EcoTILLING technológia első eleme egy kétlépéses PCR-reakció. Annak érdekében, hogy a keletkezett fragmentumokat később detektálni tudjuk, fluoreszcensen jelölt nukleotidokat építettünk a termékbe.

A PCR reakció során a 12 µl össztérfogatú reakcióelegyet az alábbi komponensekből állítottuk össze: 1 µl referencia DNS-el ekvimoláris mennyiségben kevert genomiális DNS (100 ng/µl); 1 µl, 20 µM-os koncentrációjú, a forward és a reverz primert azonos mennyiségben tartalmazó primer keverék (a primereket a vizsgálni kívánt génjelöltek szekvenciái alapján terveztük); 10 µl előre összeállított MasterMix, amely a következő összetevőket tartalmazta: 810 µl steril desztillált víz; 125 µl 10x PCR puffer; 50 mM MgCl₂; 50 µl, 5 mM-os koncentrációjú dNTP mix (GeneCraft, Köln, Németország), amelyhez 9:1 arányban adtunk dTTP és fluoreszcensen jelölt Flu-12-dUTP (GeneCraft, Köln, Németország Germany) keverékét; 15 µl Taq DNS polimeráz [Roboklon DNS polimeráz (katalógus szám: E2600) illetve GeneCraft DNS polimeráz enzim (katalógus szám: GC-045-1000 or GC-002-1000)].

A PCR reakciók és az azt követő heteroduplex képzés kivitelezésére PTC-200 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készüléket használtunk. A PCR reakciók kezdeti denaturációs lépése során a templát DNS molekulákat 94 °C-on 2 percen át denaturáltuk.

A polimerizációt 40 cikluson keresztül hajtottuk végre, a ciklusok a következő ismétlődő lépésekből tevődtek össze: denaturáció: 94 °C-on, 10 másodpercen át; annealing: 55 °C - 60 °C közötti, a primerek tulajdonságaitól függő hőmérsékleten 30 másodpercen át; extenzió: 72 °C-on, 1 – 3 percen át. A végső extenziós lépést 72 °C-on, 5 percen át folytattuk.

5.1.4. Heteroduplex képzés

A PCR-reakció második eleme az ún. heteroduplex képzés mely egy denaturálást követő fokozatosan történő lehűtést jelent. Eredményként heteroduplex molekulák képződnek a vizsgált és a referenciaként szolgáló DNS megfelelő szakaszainak összekapcsolódása nyomán.

A heteroduplex képzést megelőző PCR amplifikáció eredményeként kapott amplikonokat ismételten denaturáltuk 99 °C-on, 10 másodpercen keresztül, majd a mintákat

70 °C-os hőmérsékletre hűtöttük, ezután egy lassú, fokozatosan történő lehűtést (reannealing) végeztünk, melynek során 20 másodpercenként 0,3 °C-kal csökkentettük a reakcióelegy hőmérsékletét 70 lépésen keresztül a vizsgált és a referencia DNS megfelelő szakaszainak minél teljesebb és pontosabb összekapcsolódása érdekében.

5.1.5. Heteroduplex molekulák enzimes kezelése

A nukleotid polimorfizmusok jelenléte miatt kialakuló mismatch pozíciókban enzimatis hasítást végeztünk a DNS szálon. Erre a célra, az egyszálú DNS-re specifikus aktivitással rendelkező Cell-es (beszerzési forrás: Georg Strompen, Potsdami Egyetem, Németország) és ENDO-1-es (Serial Genetics, Evry, Franciaország) enzimet használtuk.

Az enzimreakció pontos időtartamát minden esetben a keletkezett termék mennyisége alapján becsültük meg ugyanis az optimálisnál rövidebb ideig végzett hasítás kevesebb fragmentumot eredményez, míg a túl sokáig zajló reakció a termék degradációjához vezethet a használt enzim ismert exonukleáz aktivitása miatt. A Cell-es enzim esetében a reakcióhoz az enzim törzset 10 v/v%-os hígításban használtuk (9 µl + 81 µl steril dddH₂O). Az enzimoldatból mintánként 1 µl-t pipettáztunk a mintákhoz. A kezelést 45 °C-on a termékmennyiség alapján megbecsült ideig (15 - 25 perc) végeztük. A reakció leállítása 2 µl 0,5 M-os EDTA oldat hozzáadásával történik. Az ENDO-1 es enzim estében a gyártó útmutatása alapján, illetve szintén az amplikon mennyiséget is figyelembe véve állítottuk be a reakció körülményeket.

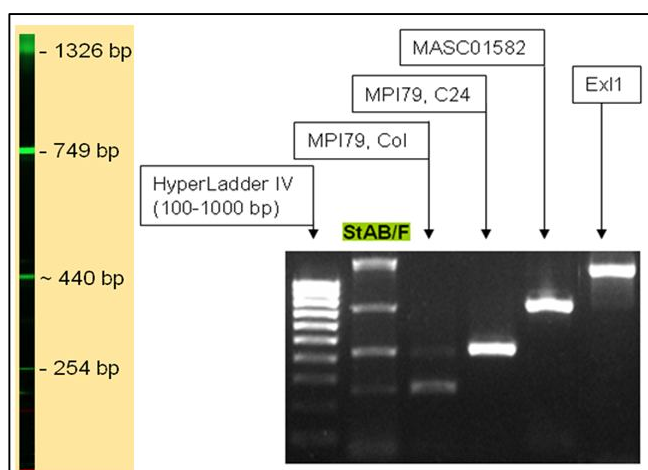
5.1.6. Minták tisztítása, előkészítése

Az amplifikáció során keletkezett, majd a Cell-es illetve ENDO-1-es enzimmel hasított termék kicsapását 20 µl izopropanol hozzáadásával végeztük. A kicsapás hatékonyságának növelése érdekében 20 percre 4 °C -ra helyeztük a mintákat, majd centrifugálással kiülepítettük a terméket. A felülúszó eltávolítása után a terméket 20 µl 76 v/v%-os etanol oldattal mostuk a detektálást zavaró fluoreszcens jelölést tartalmazó komponensek lehető legteljesebb eltávolítása érdekében. Majd PCR készülékben 25 percen át tartó, 45 °C-on végzett szárítás után visszaoldottuk a terméket a mennyiségétől függően 1,5 - 3 µl formamid pufferben (33 % formamid; 10 mM Tris; pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,02 %

bromfenol-kék). Ezután minden nyolcadik mintához hozzáadunk 0,6 µl TET markert a kísérlet kiértékelésének megkönnyítése érdekében. A gélen történő szétválasztás előtt PCR készülékben 95 °C-on denaturáltuk a mintákat.

5.1.7. Termékek méret szerinti elkülönítése, detektálás

A keletkezett hasított fragmentumok molekulaméret szerinti elkülönítését ABI 377-es gél alapú szekvenáló készüléken (Applied Biosystems, Lincoln, USA) végeztük. Mivel a futtatásokhoz nem állt rendelkezésre megfelelően detektálható, fluoreszcensen jelölt molekulatömeg standard, ezért magunk állítottunk elő, egy StAB/F elnevezésűt (7. ábra), mely 4 fluoreszcensen jelölt fragmentumot tartalmaz (254 bp, 440 bp, 749 bp, 1326 bp), mely megfelelően lefedte az általunk detektálni kívánt molekula méret tartományt.



7. ábra: Gélen történő fluoreszcens detektálásra alkalmas molekulatömeg standard fragmentumainak sematikus összefoglalása.

A minták poliakrilamid gélre történő felvitelére 100 minta felviteli hellyel rendelkező membrán fésűt (LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA) alkalmaztunk. Genotípusonként 0,5 µl mintát vittünk fel a 16 cm hosszú poliakrilamid gélre (6,5% KB Plus, LI-COR). A gélelektroforézist ABI Prism 377 gél alapú szekvenáló készüléken végeztük 1X-es hígítású TBE pufferben a következő beállítások mellett (feszültség: 1400 V, áramerősség: 60 mA, hőmérséklet: 50 °C) az elválasztani kívánt ampikon méretétől függően 2-4 órán át. A készülékhez gyártott eredeti géltartó üveglapokat lerövidítettük 36 cm-ről 24 cm-re, így jelentősen javítva a fragment elválasztás minőségén.

5.1.8. A génjelöltek kiválasztása

A szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek kiválasztása során elsősorban irodalmi adatokra támaszkodtunk. Szükséges volt, hogy a vizsgálandó lókuszról rendelkezésünkre álljon szekvencia információ, hiszen csak ez alapján tervezhetők megfelelő primerek. A génjelölteket expressziós mintázatok, QTL térképezési eredmények illetve élettani funkciójuk alapján választottuk ki.

Elsősorban az abiotikus stresszválaszban szereplő géneket tanulmányoztuk. Ezen szempontok alapján a 2. táblázatban szereplő géneket vontuk vizsgálatba.

2. táblázat: Az EcoTILLING analízis során vizsgálatba vont génjelöltek listája

Sorszám	Génjelölt neve, rövidítése	Elérhető szekvencia információ	Elhelyezkedése (lokusz)	Szakirodalmi hivatkozás
1.	Hordeum vulgare L. gene for aldose reductase, HvARH1	Genomiális DNS	Z48360	Roncarti és mtsai. (1995) Oberschall és mtsai. (2000)
2.	Hordeum vulgare L. stress responsive gene protein 6, HvSRG6	Genomiális DNS	AJ300144	Malatrasi és mtsai. (2002)
3.	Hordeum vulgare L. AP2 transcriptional activator gene, HvDRF1	Genomiális DNS	AY223807	Xu és Loveridge (2004)
4.	Hordeum vulgare L. HVA1 gene, HvA1	Genomiális DNS	X78205	Bahieldin és mtsai. (2005)
5.	Hordeum vulgare L. dehydration responsive element binding protein 1, HvDREB1	mRNS	DQ012941	Xu és mtsai. (2009)
6.	Hordeum vulgare L. mRNA for sodium/proton antiporter, HvNHX1	mRNS	AB089197	Fukuda és mtsai. (2004)
7.	Hordeum vulgare L. mRNA for vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase, HVP1	mRNS	AB032839	Fukuda és mtsai. (2004)
8.	Hordeum vulgare L. fungal pathogen induced mRNA for pathogen-related protein HvPPRPX	mRNS	X16648	Marzin és mtsai. (2008)
9.	NUD putative ethylene-responsive transcription factor HvNUD	Genomiális DNS	AP009567	Taketa és mtsai. (2008)

5.1.9. Primerek tervezése a célrégiór

A vizsgálni kívánt génszakaszok amplifikációját lehetővé tevő primereket a rendelkezésünkre álló szekvencia információk (genomiális DNS illetve mRNS) alapján terveztük. Az eredmények optimális kiértékelhetősége érdekében az amplikon méretnek lehetőleg 500 és 1500 bp közé kell esnie. Az elérhető genomiális DNS szekvenciával rendelkező, és az említett intervallumot meghaladó hosszúságú génjelöltekre több (2-4), egymással átfedő amplikont terveztünk: HvARH1 gén (4 amplikon), HvSRG6 gén (4 amplikon), HvDRF1 gén (3 amplikon), HVA1 gén (2 amplikon). Így az EcoTILLING analízis során teljes egészében feltártuk az említett gének kódoló és nem kódoló szakaszait illetve promóter régiójukat. 1-1 primerpárt terveztünk a célrégióra a HvNUD gén, illetve azon gének (HvDREB1, HvNHX1, HvPPRPX, HVP1) esetében ahol a vizsgálandó lókusztól csupán mRNS szekvencia volt elérhető. A vizsgálatba vont 9 génre a Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) program segítségével összesen 18 génszakaszra terveztünk az amplifikációt lehetővé tevő primereket (3. táblázat).

3. táblázat: Az EcoTILLING analízis során használt primerek listája:

Gén	Primer szekvencia (5'-3')	Amplikon hossz (adatbanki szekvencia alapján)
HvARH1	HvARH1F-F: GAAACATTCCCATCGCAGAC	1205 bp
	HvARH1F-R: TTTCCGAGCGAACCAGAG	
	HvARH1A-F: CTCCGATACTGCCCACTCC	863 bp
	HvARH1A-R: AGGTTCTCCATCTCCTTCCAC	
	HvARH1B-F: GTGGAAGGAGATGGAGAACC	842 bp
	HvARH1B-R: GTGAAGCCAGTATGAGTGTGG	
	HvARH1L-F: GTGCTCATCAAGTGGGCTCT	780 bp
	HvARH1L-R: GCACCCTTCCGTTATTTGG	
SRG6	SRG60-F: TGATCCAAACATCACCCAGA	927 bp
	SRG60-R: AGCAGAAGCAGGGATCTCAC	
	SRG61-F: TCATCCCTTCTGCTCATCTTC	945 bp
	SRG61-R: TGC GTTTTCTTCTCCCTCT	
	SRG62-F: TACAGCAGCCCTCCACTTCT	933 bp
	SRG62-R: CGCAATACAACAAACCACTACC	
	SRG63-F: TGTTCCTTTTCCCTTGTATGTG	821 bp
	SRG63-R: GAGCAGGTATTCGTCTGAAGC	
HvDRF1	HvDRF1AA-F: CCGACTTTTCTTTCTCCCCTC	1059 bp
	HvDRF1AA-R: TGACGACAGGATGCAACAAC	
	HvDRF1P-F: ATTTCTCCTTGGGACCTGCT	1340 bp
	HvDRF1P-R: GTTGGTTCACTTCTTCCATCG	
	HvDRF1C-F: ATGCCCCCTCTTGTGTTCATC	1252 bp
	HvDRF1C-R: GGAATCACAAACCCTCAAAG	

Gén	Primer szekvencia (5'-3')	Amplikon hossz (adatbanki szekvencia alapján)
HvA1	HVA1-F: GCCAATCTCCTCTCCACAAG	919 bp
	HVA1-R: CGAACGACCAAACACGACTA	
	HvA1L-F: GGCGAGACGGTGGTGAAC	709 bp
	HvA1L-R: ACCATGCCTGCTAAGAATCG	
HvDREB1	HvDREB1-F: GCCAAGGGTTCCAAGAAAG	620 bp (kapott amplikon hossz: 620 bp)
	HvDREB1-R: GCTTCCATTTTACATCAGCA	
HvNHX1	HvNHX1-F: TGATGAGAGGAGCTGTGTCTG	529 bp (kapott amplikon hossz: 904 bp)
	HvNHX1-R: CGAAGCTGTAGCACCTCCTT	
HvP1	HVP1-F: TTTTGTGTGTGGCTGTTGGT	988 bp (kapott amplikon hossz: 1374 bp)
	HVP1-R: CCCGAGGTGTCCTTGAGAG	
HvPPRPX	HvPPRPX-F: GCTGAAGGAGGTGGAGACAA	358 bp (kapott amplikon hossz: 571 bp)
	HvPPRPX-R: GGTCGTAGATGCGGTGCT	
HvNUD	HvNUD-F: CATTCCGCAGAGAAACATCA	1034 bp
	HvNUD-R: TGGAGAGATACTCGGCTGGT	

5.1.10. Haplotípusok azonosítása

Az amplikonok enzimatis hasításának eredményeként keletkező fragmentumok méret szerinti elkülönítését egymással párhuzamosan, egy poliakrilamid gélen végeztük. Az így keletkezett gélkép az adott amplikon hasítási mintázatát reprezentálja valamennyi vizsgált genotípus esetében.

A kiértékelési keret meghatározása után a gélkép kiértékelését PhotoFiltre 6.2.7 program szabadon letölthető verziójának (<http://www.photofiltre.com/>) használata útján manuálisan végeztük, egyenként megkeresve és megjelölve a gélképen a hasított fragmentumokat. Az egyes hasítási mintázatok egymással való összevetése útján a genotípusokat haplotípus kategóriákba soroltuk.

Az egyes haplotípusok elkülönítése után haplotípus kategóriánként egy-egy reprezentáns adott génszakaszát jelölten nukleotidokat használva ismételt PCR reakció során amplifikáltuk. Ezen kívül az egyetlen haplotípus kategóriába sem sorolható, unikális genotípusok amplifikációját is elvégeztük. A keletkezett termékeket tisztítottuk, majd mindkét (forward és reverz) irányból megszekvenáltattuk. A szekvenálásokat a Bio Basic Inc. -el, Markham, Kanada illetve esetenként a Szegedi Biológiai Kutatóközpont szekvenáló részlegében végeztettük el.

A kapott szekvenálási eredmények minőségének ellenőrzését és vizuális kiértékelését a Chromas 1.45 (McCarthy 1998) program segítségével hajtottuk végre. A szekvenálások eredményeit felhasználva többszörös illesztést végeztünk a CLC Free Workbench

(www.clcbio.com) program használata útján. Ez alapján derül ki a polimorfizmusok pontos helye és jellege. A vizsgálataink eredményeként feltárt szekvencia adatokat az NCBI adatbázisában is hozzáférhetővé tettük az alábbi elérési számokon: GU108387-GU108455.

5.2. Molekuláris markerek kifejlesztése és a genotípus kollekció genotipizálása

5.2.1. Molekuláris marker készlet

Az allélvariánsok egyértelmű megkülönböztetését lehetővé tevő molekuláris markereket terveztünk azon gének (HvARH1, HvSRG6, HvDRF1 és HVA1) esetében, ahol korábban már a gén teljes szakaszának genetikai variabilitását feltártuk az átfedő amplikonok vizsgálatát magában foglaló EcoTILLING vizsgálattal. Az elvégzett analízis eredményeképpen ismertté vált a felsorolt gének szekvenciája valamennyi vizsgált genotípus esetében, így fény derült polimorfizmusok pontos számára és elhelyezkedésére. Ezeket az adatokat táblázatban foglaltuk össze. Az adatokat áttekintve valamennyi gén esetében összeállítottunk egy olyan polimorfizmus szettet, melyeket molekuláris markerként alkalmazva megállapítható, hogy az adott genotípusban melyik allélvariáns van jelen.

5.2.2. A genotípus kollekció ismételt genotipizálása

A markerek alkalmasságának bizonyítása, illetve a korábban kapott adatok megerősítése céljából elvégeztük a teljes 92 genotípust tartalmazó árpa kollekció molekuláris markerekkel történő újra genotipizálását is. A genotipizáláshoz használt primereket (4. táblázat) az EcoTILLING analízis során kapott szekvenciák alapján terveztük, valamennyi haplotípus bázissorrendjének figyelembevételével.

A molekuláris markerekkel történő genotipizálás során a polimorfizmus jellegétől függően többféle módszer alkalmazása vált szükségessé. A fluoreszcens festékkel jelölt molekulák detektálása valamennyi esetben az EcoTILLING-hez használt szekvenátor berendezésen történt.

4. táblázat: Az ismételt genotipizálás során használt primerek listája

Gén	Primer	Vizsgált polimorfizmus típusa	Kimutatási módszer
HvARH1	HvARH1-2I-F: GAGACCTCCATGGATTGCAG	2. InDel (74 bp / 64 bp)	SSLP
	HvARH1-2I-R: ATGTGCCCCTCCTCTAGTCC		
	HvARH1-7I21S-F: GCTCGGAAATGACGATAGGA	7. InDel (88 bp / 83 bp)	SSLP
	HvARH1-7I21S-R: GTGTCCACATGCCTGTATCC	21. SNP (G/T)	SNaPshot
	HvARH1-21S-S: TTTTTTTTTTTCGGAAATGACGATAGGATTATAT		
	HvARH1-41S42S-F: CCTGGTTGGAAGAACGACAA	41. and 42. SNP	ENDO1
	HvARH1-41S42S-R: CGATATCACACCAGCAAGGTT		
	HvARH1-51S-F: AGAGGGGGACGAGTGTGAT	51. SNP (CCCG/CCGG)	CAPS (MspI)
	HvARH1-51S-R: CACCGCTCACCTCATCTTTT		
	HvARH1-56S-F: GGGGAGGAGCTGTTCGTG	56. SNP (T/G)	SNAPshot
	HvARH1-56S-R: GATGATGCATGGGAGCTCAG		
	HvARH1-56S-S: TTTTTTCTGGGATCACGAGAACTGAGCT		
SRG6	SRG6-1I-F: TGCAAACCTACCGAGCACAA	1. InDel (336 bp / 140 bp)	SSLP
	SRG6-1I-R: AGGAGAAGCAACGAGTGGAG		
	SRG6-4I5I-F: TCACTGCCTCTGCTAATCCA	4. InDel and 5. InDel	SSLP
	SRG6-4I5I-R: GACCAGTTTCAGCTGCTTCC	(745 bp / 720 bp / 668 bp)	
HvDRF1	HvDRF1-1I-F: CCATGACGGTAGATCGGAAG	1. InDel (286 bp / 283 bp)	SSLP
	HvDRF1-1I-R: TCCCCAAATTCCTACAGCAC		
	HvDRF1-4I15S-F: TGAGCCATTGGAGCCTATCT	4. InDel (249 bp / 264 bp)	SSLP
	HvDRF1-4I15S-R: AAGCCATCCAGGTACAGAGG	15. SNP (CCCG/CCGG)	CAPS (MspI)
HvA1	HVA1-1I-F		
	HVA1-1I-R		
	HVA1-2I-F		
	HVA1-2I-R		

A kiválasztott InDel-eket is magában foglaló génszakaszokat fluoreszcens festék (Flu-12-dUTP) beépítése mellett amplifikáltunk, majd a keletkezett, eltérő hosszúságú fragmentumokat méretük szerint elkülönítettük. Ezen reakciót duplex formában is végeztük, így egyszerre 2 InDel jelenléte is kimutatható volt SSLP markerek formájában.

Az ún. CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) reakció a keletkezett Flu-12-dUTP-vel jelölt PCR-termék restriktációs endonukleázokkal történő hasításán alapszik. Jelen esetben az MspI (MBI Fermentas, Vilnius, Litvánia) enzim számára specifikus hasító helyet tartalmazó SNP polimorfizmust magában foglaló unikális haplotípus kimutatására szolgált.

Bizonyos SNP-k kimutatása céljából a polimorfizmust körülvevő génszakasz PCR amplifikációja után keletkező és a referenciaként választott haplotípusról képződő ampikon együttes hevítése útján heteroduplex molekulákat alakítottunk ki. Ezután a keletkező terméken enzimátikus hasítást végeztünk CeiI illetve ENDO1 enzimekkel, így a polimorfizmusok jelenléte következtében ismert méretű fragmentumok képződtek.

A SNaPshot módszernél (Duplex SNaPshot assays; Applied Biosystems, Lincoln, USA) a PCR reakcióhoz közvetlenül az SNP mellé tervezett primert és fluoreszcens festékkel jelölt dideoxi-nukleotidokat használtunk (Törjék és mtsai. 2003). A reakció során csupán egyetlen nukleotiddal hosszabbodhat meg a primer, mégpedig csupán olyannal, mely az SNP-t alkotó nukleotiddal bázispár kialakítására képes. Az, hogy melyik nukleotid épül be, a gélekben a fluoreszcens festék által okozott színből derül ki.

5.3. A genotípus-törzskollekció fenotípezálása

Az EcoTILLING módszerrel feltárt genotípusos eredmények mellett szükségessé vált a vizsgált árpa vonalak szárazságtoleranciájának meghatározása is. Kísérleteinket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont fejlesztésében, a Szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft.-vel közösen létrehozott Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával, üvegházi körülmények között végeztük.

5.3.1. A genotípus részkollekció összeállítása

A szárazságtolerancia mértékének tesztelése érdekében összeállítottunk egy 23 árpa genotípusból álló törzskollekciót, mely részét képezi az EcoTILLING analízishez használt tágabb genotípus kollekciónak. A genotípusok kiválasztásakor arra törekedtünk, hogy a szárazságtolerancia tekintetében magas variabilitással rendelkezzen a részkollekció.

A genotípusok kiválasztása során egyaránt figyelembe vettünk szárazságtűrésre vonatkozó irodalmi adatokat és adatbanki információkat, illetve saját előzetes fenotípezálási eredményeinket. Ezen szempontok alapján az alábbi, az 1. táblázatban már részletezett genotípusokat vontuk vizsgálatba:

#1 - Albacete	#49 - ICB78 - 0614-4AP	#75 - RIHANE-01
#3 - Keystone	#51 - SECO	#79 - Compana
#7 - AZ8501	#56 - Monlón	#81 - OLTE'S'
#8 - Hazen	#58 - ICB79-0583-2AP	#86 - Fengtien Black
#17 - Arabi Aswad	#60 -ARTA	#87 - ARDA
#18 - Otis	#66 - Scarlett	#91 - GK Habzó
#24 - Hex. Wh. Barley	#70 - Tadmor	#99 - SCA118
#48 - WI2291	#74 - ICB77-0091	#101 - SCA239

5.3.2. Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer

A kiválasztott genotípusok szárazságtoleranciájának tesztelését a Gabonakutató Nonprofit Kft. telephelyén található Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával végeztük el. A genotípusok fenotípusos és agronómiai paramétereinek tesztelése az automatizált rendszer segítségével pontosan szabályozott körülmények között történt, kontroll (optimális vízellátás) és stressz (vízmegvonás) körülmények között.

5.3.2.1. Kísérleti körülmények

A kivetett 23 árpa genotípust a kelést követően hidegkamrában 6 °C-on, 4 héten át vernalizáltuk, emellett a hidegkezelés hatására egymással fejlődési fázis tekintetében szinkronba kerültek az eredetileg növekedés és habitus tekintetében is jelentősen eltérő genotípusok. Ezt követően a csíranövényeket nevelő edényekbe ültettük át.

A talajt virágföld és homok 1:1 arányú keverékéből állítottuk elő. A növények folyamatos tápanyagellátását 4 g speciális, fokozatosan oldódó műtrágya (Substral Osmocote) talajhoz keverésével biztosítottuk. Genotípusonként 10 növényt vizsgáltunk 5 növényt optimális vízellátás, további 5 növényt vízmegvonás mellett neveltünk. A kontroll növények talajának vízkapacitását 60 %-on tartottuk, a stressz hatást pedig 20 %-os nedvességtartalommal idéztük elő. Az öntözést és a digitális fényképezést hetente végeztük a teljes tenyészidőszak alatt. A további agronómiai paraméterek meghatározását is elvégeztük a hetente történő fenotipizálás során illetve a betakarítást követően.

5.3.2.2. A növények vízfelhasználásának meghatározása

A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer, öntözést végző eleme egyrészt alkalmas arra, hogy a fejlődő növények számára a teljes tenyészidőszak alatt állandó talajnedvességet biztosítson, másrészt folyamatosan regisztrálja a növények vízfelhasználásának mértékét is. A növények kiültetésétől kezdődően a számítógéphez kapcsolt automata öntöző berendezéshez tartozó mérleg (GSE model 350, 6000±1 g) segítségével hetente tömeg alapján meghatározásra került a növény által felhasznált vízmennyiség, melyet számítógép vezérelt perisztaltikus pumpa (Gilson Minipuls 3) segítségével pótolunk. A növények azonosítása szintén automatikusan, a cserépre helyezett egyedi rádiófrekvenciás azonosító elemekkel (RF

proximity TAG) történt. Az egyes növényekhez tartozó vízfelhasználási adatok automatikusan regisztrálásra és tárolásra kerültek.

5.3.2.3. A pixel alapú zöldfelület jellemzése digitális fotográfiával

A növények teljes életciklusa során bekövetkező zöldfelület gyarapodást folyamatosan, digitális felvételek készítése és feldolgozása útján követtük nyomon. A növények azonosítása szintén az egyedi rádiófrekvenciás azonosítókkal történt. Valamennyi növényről hetente Olympus C-7070WZ digitális fényképezőgép segítségével készültek felvételek. A növényeket a cserép 32-33°-os elforgatásával, 11 oldalnézeti szögből fotóztuk.

Az egyes növényekről készített fényképek tárolásra, majd kiértékelésre kerültek. A számítógépes analízis során a zöldfelület pixel alapú becslését a folyamatosan készített digitális fotók zöld színű pixel pontjai alapján végeztük. A föld feletti zöld növényi részek felületének kiszámításakor a tenyészedeények felső peremének átmérőjét használtuk méretbeli viszonyítási alapként.

5.3.2.4. Levélhőmérséklet meghatározás

A növények transzspirációs aktivitását levélhőmérséklet mérésekkel jellemeztük. A tenyészidőszak alatt 2 alkalommal végeztük el a növények zászlósleveleinek felületi hőmérsékletének meghatározását magas érzékenyséű (0,03 °C) hőkamera (VarioSCAN 3021 ST) segítségével. Az első mérést a növények virágzásakor, a második mérést pedig a szemfeltöltődés idején végeztük el. A mért értékeket a növényeket körülvevő levegő hőmérsékletéhez viszonyítottuk.

6. Eredmények

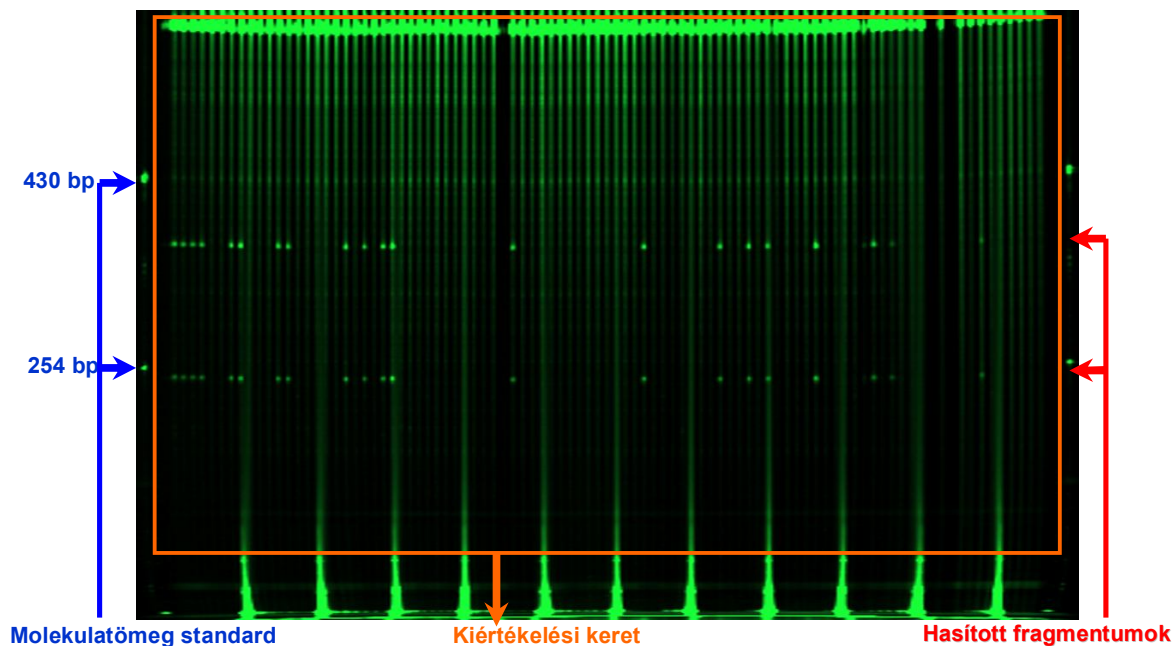
6.1. A szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó gének természetes variabilitásának vizsgálata EcoTILLING módszerrel

6.1.1. A génjelöltekre tervezett ampikonok EcoTILLING vizsgálata

Árpa szárazságtűréssel foglalkozó irodalmi adatok alapján az EcoTILLING vizsgálathoz 9, a szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó gént választottunk ki a rendelkezésünkre álló szakirodalmi adatok alapján.

Első lépésként a kijelölt génszakaszok felszaporítására alkalmas primereket terveztünk a vizsgálandó lókusztól rendelkezésre álló szekvencia információk alapján. A PCR-reakció és az azt követő heteroduplex képzés után a nukleotid polimorfizmusok jelenléte miatt kialakuló mismatch pozíciókban enzimatis hasítást végeztünk a DNS szálon. Erre a célra, az egyszálú DNS-re specifikus aktivitással rendelkező Cell1-es és Endo1-es enzimeket használtuk. Végül elvégeztük a hasított fragmentumok molekulaméret szerinti elkülönítését illetve a keletkezett termékek detektálását gél alapú szekvenáló készüléken.

A kiválasztott 9 gén EcoTILLING analízisét összesen 18 ampikon vizsgálata útján végeztük el a teljes, 92 árpa genotípust tartalmazó kollekción. Vizsgálataink kezdeti lépéseként elvégeztük többek között a HvDREB1 (dehydration responsive element binding protein 1) 620 bázispárnyi régiójának amplifikációját illetve EcoTILLING analízisét is. A 8. ábra a HvDREB1 gén vizsgált ampikonjának EcoTILLING gélképét mutatja be a vizsgált 92 genotípus esetében.



8. ábra: A HvDREB1 gén EcoTILLING mintázata. A Cel-1 es enzimmel történő kezelés eredményeként a kiértékelési keretben mindössze 2 féle - hasított fragmentumok nélküli és hasított fragmentumokat tartalmazó - mintázatot azonosítottunk.

6.1.2. Az azonosított haplotípusok szekvenálása és a polimorfizmusok detektálása

Az EcoTILLING mintázatok kiértékelése során az azonos hasított fragmentumokat tartalmazó mintákat haplotípus kategóriákba soroltuk. Majd kategóriánként egy-egy reprezentánst kiválasztva ismételt amplifikáció után a különböző génvariánsokat tartalmazó mintákat mindkét irányból megszekvenáltattuk. A forward és reverz szekvenciák összehasonlítása után a haplotípus szekvenciák felhasználásával illesztést végeztünk, melynek kiértékelése nyomán meghatároztuk az adott ampikonban előforduló polimorfizmusok pontos elhelyezkedését illetve jellegét (9. ábra).

HvDREB1-5A	ATCTCCTCCTTCTTGTCTCAAATGCGCC	G	ACAGCTGCGCTGCATCGGTCTGATGCCAAG
HvDREB1-4B	ATCTCCTCCTTCTTGTCTCAAATGCGCC	A	ACAGCTGCGCTGCATCGGTCTGATGCCAAG

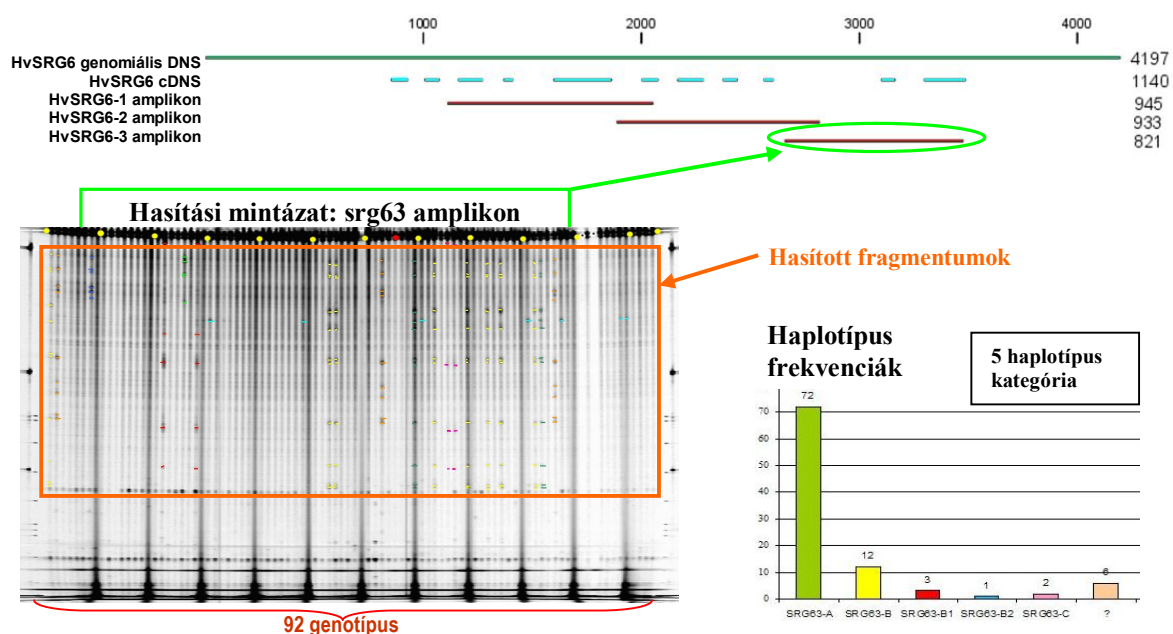
↓
1. SNP: guanin – adenin tranzíció

9. ábra: A HvDREB1 gén szekvenciáinak illesztése.

A szekvenciák illesztése nyomán kiderült, hogy a kimutatott, kódoló régióban elhelyezkedő SNP polimorfizmus háttérében egy guanin - adenin csere, azaz purin bázisok

közötti tranzíció történt. Jelen esetben például két szekvenálás elvégzésével ismertté vált mind a 92 genotípus vizsgált génszakaszának bázissorrendje.

A 10. ábra a haplotípusok azonosításának folyamatát szemlélteti a *HvSRG6*-os génre tervezett 3-as ampikon példáján keresztül.



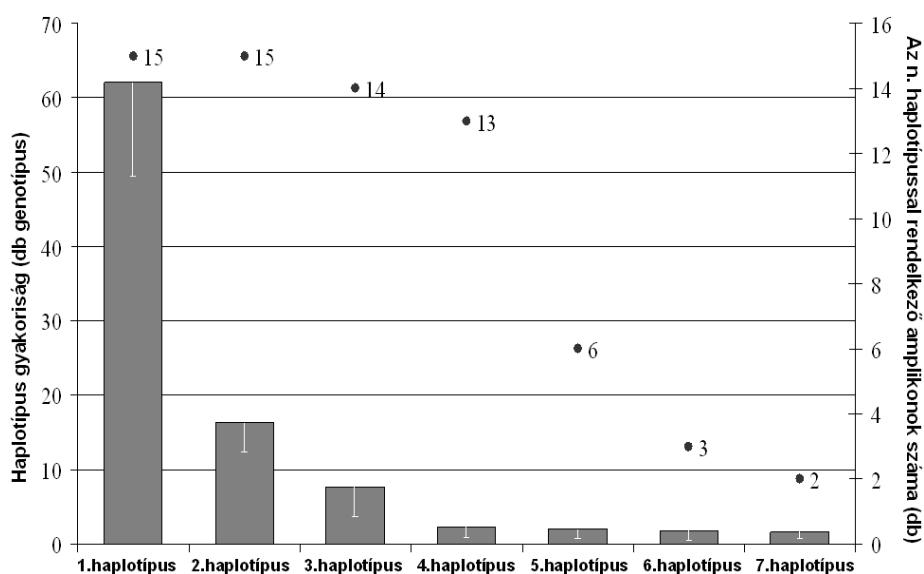
10. ábra: Az allélvariánsok azonosításának folyamata az EcoTILLING módszerrel a *HvSRG6* gén 3. ampikonjában. A Cel-1 es hasítás eredményeként kapott hasított fragmentum mintázat alapján a 92 genotípus 5 haplotípus kategóriába volt sorolható.

Kutatásaink során 9 génjelölt EcoTILLING vizsgálatát végeztük el összesen 18 ampikon analízise útján /*HvARH1* gén (4 átfedő ampikon), *HvSRG6* gén (4 átfedő ampikon), *HvDRF1* gén (3 átfedő ampikon), *HvA1* gén (2 átfedő ampikon), *HvDREB1* gén (1 ampikon), *HvNHX1* gén (1 ampikon), *HvPI* gén (1 ampikon), *HvPPRPX* gén (1 ampikon), *HvNUD* gén (1 ampikon)/. Az 571 bp és 1374 bp közötti hosszúság intervallumban elhelyezkedő ampikonok segítségével genotípusonként összesen mintegy 17000 bp hosszúságú génszakasz természetes variabilitását tártuk fel. Ebből következően összesen mintegy 1,5 millió bp-nyi genomiális szekvencia pontos bázissorrendje vált ismertté az EcoTILLING analízis során.

3 vizsgált ampikon esetében (*HvSRG6-0*, *HVA1-F*, *HvDRF1-AA*) a nehezen kiértékelhető illetve hiányos EcoTILLING mintázatok miatt nem lehetett minden genotípust egyértelműen haplotípus kategóriákba sorolni. A bizonytalan esetekben további

szekvenálások elvégzésével állapítottuk meg a haplotípus kategóriákba nehezen besorolható genotípusok pontos szekvenciáját. Azokban az esetekben mikor bizonyos genotípusok adott génjéről többszöri próbálkozás eredményeként sem keletkezett az EcoTILLING vizsgálat elvégzéséhez szükséges mennyiségű amplikon, ott a haplotípus frekvenciákat nem lehetett pontosan megállapítani. Ezért a fent említett 3 amplikont kihagytuk az erre vonatkozó statisztikai számításokból.

Az statisztikailag elemzett 15 amplikonban az azonosított haplotípusok száma 2-től 7-ig terjedt. Amplikononként átlagosan 4,5 haplotípus kategóriát állítottunk fel. A 11. ábra egyrészt a vizsgált gének 15 amplikonjához tartozó, gyakoriság szerint rangsorolt haplotípusok előfordulásának átlagos gyakoriságát ábrázolja a genotípus kollekcióban. Másrészt az n. haplotípussal rendelkező amplikonok számát hivatott megjeleníteni. A kapott gélképek nyomán minden esetben legalább két haplotípus kategória jelenléte igazolódott. A vizsgált 15 amplikon többségében (13 amplikonban) legalább 4 génvariáns volt elkülöníthető.



11. ábra: A amplikonok egyes haplotípusainak átlagos gyakorisága a genotípus kollekcióban, illetve az n. haplotípussal rendelkező amplikonok száma.

Az egyes haplotípus kategóriákba sorolható genotípusok arányában lényeges mértékű eltérések figyelhetők meg. Ezen mutató tekintetében például az amplikonok többségében megtalálható 4 haplotípus kategória között nagyságrendi eltérés mutatkozott: míg a legnagyobb gyakoriságot tükröző 1. haplotípus kategóriába a vizsgált 92 genotípusok közül átlagosan több mint 60 db tartozott; addig a gyakoriság szerinti 4. kategóriába átlagosan alig 3 genotípus volt besorolható. A statisztika tanulsága szerint a genotípus kollekció vizsgált

génszakaszainak többségében mindössze 3 haplotípus volt kimutatható jelentős arányban, a további haplotípusok döntő többsége inkább unikálisnak tekinthető.

Vizsgálataink során a 92 genotípust tartalmazó árpa kollekció 9 vizsgált génjében összesen 94 haplotípus kategóriát állítottunk fel, 46 InDel (Inszerció/Delécio)-t és 185 SNP (egy bázispárt érintő polimorfizmus)-t detektáltunk. A feltárt polimorfizmusok közül 53 SNP és 5 InDel helyezkedett el kódoló régióban. Az exonikus szakaszokon detektált SNP-k közül pedig összesen 22 okozott aminosav cserével járó mutációt a génről keletkező fehérje termékben. A polimorfizmusok amplikonkénti valamint összegzett paramétereit az 5. összefoglaló táblázat tartalmazza.

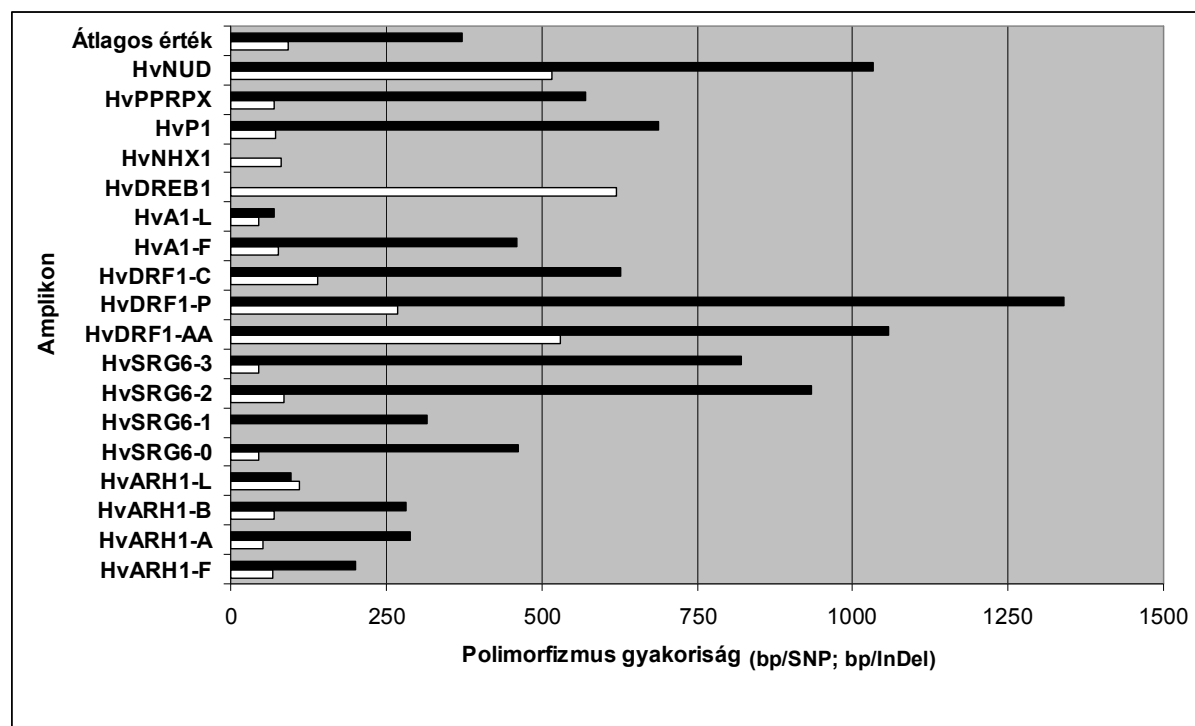
5. táblázat: Az EcoTILLING vizsgálat eredményeinek összefoglalása.

Gén	Amplikon	Összes azonosított SNP(db)	Kódoló régióban található SNP(db)	Aminosav cserét okozó SNP(db)	Összes azonosított InDel(db)	Kódoló régióban található InDel
HvARH1	HvARH1-F	18	1	1	6	0
	HvARH1-A	17	2	0	3	0
	HvARH1-B	12	3	1	3	0
	HvARH1-L	7	4	2	8	0
HvSRG6	HvSRG6-0	20	0	0	2	0
	HvSRG6-1	0	0	0	3	0
	HvSRG6-2	11*	4	1	1	0
	HvSRG6-3	18(-2)*	2	1	1	0
HvDRF1	HvDRF1-AA	2	0	0	1	1
	HvDRF1-P	5	0	0	1	0
	HvDRF1-C	9	9	8	2	1
HvA1	HvA1-F	12(*)	6	5	2	2
	HvA1-L	16(-1*)	1	1	10	1
HvDREB1	HvDREB1	1	0	0	0	0
HvNHX1	HvNHX1	11	7	0	0	0
HVP1	HvP1	18	8	1	2	0
HvPPRPX	HvPPRPX	8	5	2	1	0
HvNUD	HvNUD	2	1	0	1	1
Összegzett érték:		185	53	22	46	5

* = átfedő amplikonokkal vizsgált gének esetében több amplikonban is előforduló ugyanazon polimorfizmus jelenléte miatt a táblázatban másodikként szereplő amplikon polimorfizmus számát korrigáltuk.

6.1.3. A polimorfizmusok gyakoriságának alakulása a vizsgált amplikonokban

A detektált polimorfizmusok közül az SNP polimorfizmusok átlagosan 92,4 bp-onként fordultak elő. A detektált InDel polimorfizmusok pedig átlagosan 371,7 bp-onkénti gyakorisággal fordultak elő az EcoTILLING analízissel vizsgált amplikonokban (12. ábra).



12. ábra: Átlagos SNP gyakoriság (bp/SNP) (■), és az átlagos InDel gyakoriság (bp/InDel) (□) a vizsgált amplikonokban.

6.2. Könnyen detektálható genetikai markerek kifejlesztése

Néhány általunk fontosnak ítélt, illetve a pontos genomiális DNS szekvencia birtokában átfedő amplikonok tervezésével teljes hosszukban vizsgált génre molekuláris markereket terveztünk. Az allélvariánsok egyértelmű, és egyszerű elkülönítését lehetővé tevő molekuláris markerek használata nagyban segítheti a későbbi expressziós illetve géntérképezési kísérletek elvégzését. Emellett a könnyen detektálható molekuláris markerek felhasználhatók lehetnek az árpa nemesítés markeres támogatásában. A szárazságtűrés szempontjából funkcionális allélvariánsok ismeretében a kifejlesztett genetikai markerek felhasználhatók lehetnek a markerekre alapozott szelekció során a preferált génvariáns nyomon követésében. A haplotípus szekvenciák és a feltárt polimorfizmusok birtokában olyan marker-kombinációkat konvertáltunk molekuláris markerekké, amelyek alkalmasak a populációban előforduló leggyakoribb haplotípusok detektálására illetve elkülönítésére. A

marker-kombinációk kiválasztása során ügyeltünk arra, hogy a markerek az aminosav szinten is különbséget mutató haplotípusokat is el tudják különíteni.

Összesen 4, a szárazságtolerancia kialakításában irodalmi adatok alapján jelentős szereppel bíró génre *HvARH1*, *HvA1*, *HvSRG6*, *HvDRF1*/ könnyen detektálható, lehetőség szerint elsősorban fragment hosszúság eltéréseken alapuló SSLP markereket fejlesztettünk ki. Ezek a markerek alkalmasak a fent említett gének összes ismert haplotípusának egyértelmű elkülönítésére.

6.2.1. Markerfejlesztés az aldóz-reduktáz (*HvARH1*) génre

Elsőként az aldóz-reduktáz enzim génjére (*HvARH1*) terveztünk egyszerűen detektálható genetikai markereket. Az aldóz-reduktáz enzim a különféle stresszhatások eredményeként bekövetkező lipid-peroxidációtól védi a sejteket, elsősorban a lipid aldehidek és szabad gyökök semlegesítésében játszik szerepet. Az abiotikus stressz toleranciában betöltött jelentős szerepét irodalmi adatok támasztják alá (Oberschall és mtsai. 2000; Hideg és mtsai. 2003; Hegedűs és mtsai. 2004; Túróczy és mtsai. 2011).

Ezért is tartottuk fontosnak elvégezni a teljes gént és nukleotid környezetét magában foglaló 3346 bp-nyi szekvencia EcoTILLING analízisét, mely során fény derült a polimorfizmusok pontos számára, elhelyezkedésére és jellegére. A *HvARH1* gén genomiális szekvenciájára 4 amplikont terveztünk, amelyeket EcoTILLING vizsgálatba vontunk (13. ábra). Így teljes szekvencia információval rendelkezünk az exonikus, az intronikus illetve a promóter régióról egyaránt. A szekvencia analízis legfontosabb elemeit a 6. táblázat foglalja össze.



13. ábra: A *HvARH1* gén teljes szekvenciájára tervezett 4 amplikon elhelyezkedése.

6. táblázat: A *HvARH1* gén teljes szekvenciáját lefedő amplikonok EcoTILLING eredményeinek összefoglalása.

Amplikon neve:	HvARH1-F	HvARH1-A	HvARH1-B	HvARH1-L
Amplikon hossza:	1205 bp	863 bp	842 bp	780 bp
Haplotípusok száma:	3	5	4	4
Összes SNP:	18	17	12	9
Kódoló SNP:	1	2	3	4
Aminosav csere:	1	0	1	2
InDelek száma:	6	3	3	9
InDelek hossza (bp):	1, 10, 1, 1, 2, 6	5, 2, 18	1, 1, 1	1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1
Kódoló InDelek:	0	0	0	0

A kapott polimorfizmus információkat táblázatban foglaltuk össze (7/a. táblázat). Az adatokat áttekintve kiderült, hogy a 77 polimorfizmus (56 SNP és 21 InDel) közül csupán 7 vizsgálata alapján egyértelműen elkülöníthető mind a 9 allélvariáns, azaz eldönthető, hogy az adott növény genomja melyik allélvariánst tartalmazza. Összesen 2 InDel és 5 SNP polimorfizmust konvertáltunk át molekuláris markerekké (7/b. táblázat).

7/a. táblázat: A *HvARH1* gén szekvenciájában azonosított polimorfizmusok összefoglaló táblázata. A molekuláris markerekké átkonvertált SNP (S) és InDel (I) polimorfizmusok narancssárgán, az aminosav cserét okozó mutációk zölden kerültek kiemelésre.

Polimorfizmus	ATG start ponthoz viszonyított pozíció	Aminosav csere típusa	Genomiális szekvencia	Allélvariánsok							
				HvARH-Z1	HvARH-Z2	HvARH-Z3	HvARH-Z4	HvARH-Z5	HvARH-Z6	HvARH-Z7	HvARH-Z8
1.I	-846	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-
1.S	-846	-	C	C	C	C	C	C	T	C	C
2.S	-745	-	G	G	A	G	A	A	A	G	A
2.I	-744	-	+10bp	+9bp	-	+9bp	-	-	-	+9bp	-
3.S	-686	-	A	A	G	A	G	G	G	A	G
4.S	-668	-	G	G	A	G	A	A	G	G	A
5.S	-649	-	G	G	A	G	A	A	G	G	A
6.S	-631	-	C	C	C	C	G	G	G	C	G
7.S	-591	-	T	T	G	T	C	C	C	T	C
3.I	-558	-	C	C	C	C	C	C	-	C	C
8.S	-550	-	T	T	T	T	T	T	C	T	T
9.S	-509	-	G	C	C	C	C	C	C	C	C
10.S	-508	-	G	C	C	C	C	C	C	C	C
11.S	-463	-	C	C	C	C	C	C	T	C	C
4.I	-404	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
12.S	-301	-	C	G	G	G	G	G	G	G	G
13.S	-300	-	G	C	C	C	C	C	C	C	C
14.S	-154	-	C	C	C	C	C	C	T	C	C
5.I	-135	-	-	-	-	-	-	-	CT	-	-
15.S	-126	-	T	T	T	T	T	T	C	T	T
16.S	-93	-	T	T	G	T	G	G	G	T	G
6.IND	-68	-	-	-	+6bp	-	+6bp	+6bp	+6bp	-	+6bp
17.S	-58	-	A	A	G	A	G	G	A	A	G
18.S	148	T/A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
19.S	207	-	A	A	C	A	C	C	C	C	C
20.S	222	-	G	G	A	G	A	A	A	A	G
21.S	269	-	G	G	G	T	G	G	G	G	G

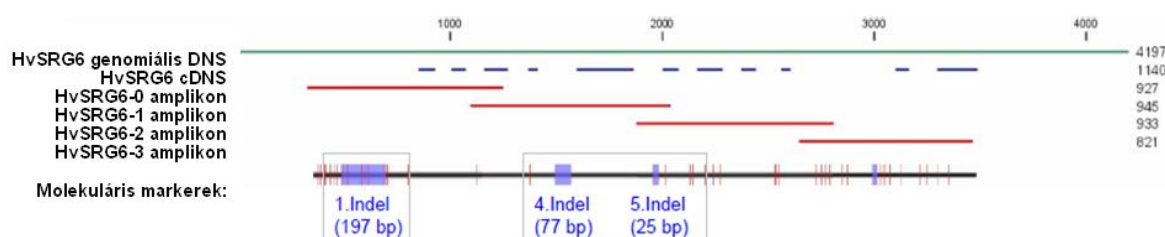
Polimorfizmus	ATG start ponthoz viszonyított pozíció	Aminosav csere típusa	Genomiális szekvencia	Allélvariánsok							
				HvARH- Z1	HvARH- Z2	HvARH- Z3	HvARH- Z4	HvARH- Z5	HvARH- Z6	HvARH- Z7	HvARH- Z8
7.I	273	-	CTGTA	CTGTA	-	CTGTA	-	-	-	-	CTGTA
22.S	299	-	C	C	T	C	T	T	T	T	T
23.S	352	E/E	G	G	A	G	A	A	A	A	G
24.S	370	-	C	C	T	C	T	T	T	T	C
8.I	378	-	-	-	TA	-	TA	TA	TA	TA	-
25.S	384	-	C	C	A	C	A	A	C	C	C
26.S	385	-	C	C	T	C	T	T	T	T	C
27.S	392	-	A	A	G	A	G	G	G	G	A
9.I	402	-	-	-	+18bp	-	+18bp	+18bp	+18bp	+18bp	-
28.S	422	-	T	T	A	T	A	A	A	A	T
29.S	478	G/G	A	A	G	A	G	G	G	G	A
30.S	549	-	A	A	A	A	A	A	C	C	A
31.S	565	-	T	T	G	T	G	G	G	G	T
32.S	786	-	G	G	G	G	G	G	A	A	G
33.S	790	-	G	G	G	G	G	G	A	A	G
34.S	800	-	G	G	G	G	G	G	A	A	G
35.S	810	-	C	C	T	C	T	T	C	C	T
36.S	1031	L/L	T	?	?	?	C	C	C	C	C
37.S	1054	P/P	A	A	A	A	A	A	A	A	C
38.S	1074	-	T	T	T	T	T	T	T	T	G
39.S	1099	-	C	C	C	C	C	T	T	T	C
10.I	1132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
40.S	1136	-	C	C	C	C	A	C	C	C	C
41.S	1240	I/V	A	A	A	A	G	G	G	G	G
42.S	1273	-	G	G	G	G	A	G	G	G	A
43.S	1327	-	T	T	T	T	C	C	C	C	C
11.I	1352	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
44.S	1360	-	G	G	G	G	G	G	G	G	C
45.S	1444	-	T	T	T	T	C	C	C	C	C
46.S	1453	-	C	C	C	C	C	C	C	C	G
12.I	1470	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-
47.S	1489	-	G	G	G	G	A	A	A	A	G
48.S	1550	-	C	C	C	C	C	C	C	C	T
49.S	1585	-	G	G	G	G	G	G	G	G	T
50.S	1695	I/I	T	T	T	T	T	T	T	T	C
51.S	1717	P/P	C	C	C	C	C	C	C	C	G
13.I	1805	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A
14.I	1808	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A
52.S	1829	-	G	G	G	G	T	T	T	T	T
15.I	1886	-	-	C	C	C	C	C	C	C	C
16.I	1890	-	--	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
17.I	1911	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A
18.I	1953	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A
19.I	1976	-	-	T	T	T	T	T	T	T	T
53.S	2136	-	A	A	A	A	A	A	G	G	G
20.I	2221	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-
54.S	2297	R/A	C	G	G	G	G	G	G	G	G
55.S	2298	R/A	G	C	C	C	C	C	C	C	C
56.S	2327	-	T	T	T	T	T	T	G	G	T
21.I	2363	-	C	C	C	C	C	C	-	-	C

7/b. táblázat: Az egyes génvariánsok elkülönítésére kiválasztott polimorfizmusok egyes génvariánsokban jelenlévő változatainak áttekintő összefoglalása

Génvariáns	2. InDel	21. SNP	7. InDel	41. SNP	42. SNP	51. SNP	56. SNP
Genomiális	10 bp	G	5 bp	A	G	C	T
HvARH-Z1	9 bp	G	5 bp	A	G	C	T
HvARH-Z2	.	G	.	A	G	C	T
HvARH-Z3	9 bp	T	5 bp	A	G	C	T
HvARH-Z4	.	G	.	G	A	C	T
HvARH-Z5	.	G	.	G	G	C	T
HvARH-Z6	.	G	.	G	G	C	G
HvARH-Z7	9 bp	G	.	G	G	C	G
HvARH-Z8	.	G	5 bp	G	A	G	T

6.2.2. Markerfejlesztés a *HvSRG6*, a *HvDRF1* és a *HvA1* génre

Mindhárom gén esetében előzőleg a gén teljes hosszán átfedő amplikonok segítségével EcoTILLING analízist hajtottunk végre a természetes genetikai variabilitás feltárása érdekében. Ennek eredményeként a vizsgált génekben megtalálható polimorfizmusok elhelyezkedésére és típusára fény derült a 92 tagot számláló genotípus kollekcióban. A *HvSRG6* gén esetében a génszakasz teljes hosszában azonosított 56 polimorfizmus (49 SNP és 5 InDel) közül 3 InDel-t választottunk ki az egyes génvariánsok elkülönítése céljából. Detektálásukra elegendő volt 2 SSLP marker alkalmazása a példaként bemutatott *HvSRG6* gén esetében (14. ábra). Az amplifikáció során 2 primerpárt használtunk, melyek közül az egyik a 1. InDel, a másik pedig a 4. és az 5. InDel amplifikációját és vizsgálatát tette lehetővé. A *HvDRF1* génre 3, a *HvA1* génre pedig szintén 2 informatív polimorfizmust konvertáltunk át könnyen detektálható SSLP markerekké, melyek lehetővé tették valamennyi allélvariáns egyértelmű megkülönböztetését. Az említett gének ismételt genotipizálása során használt primerek, valamint a molekuláris markerekkel elkülöníthető polimorfizmusok főbb jellemzői az Anyagok és módszerek rész 5.2.2. fejezetében, a 4. táblázatban kerültek összefoglalásra.

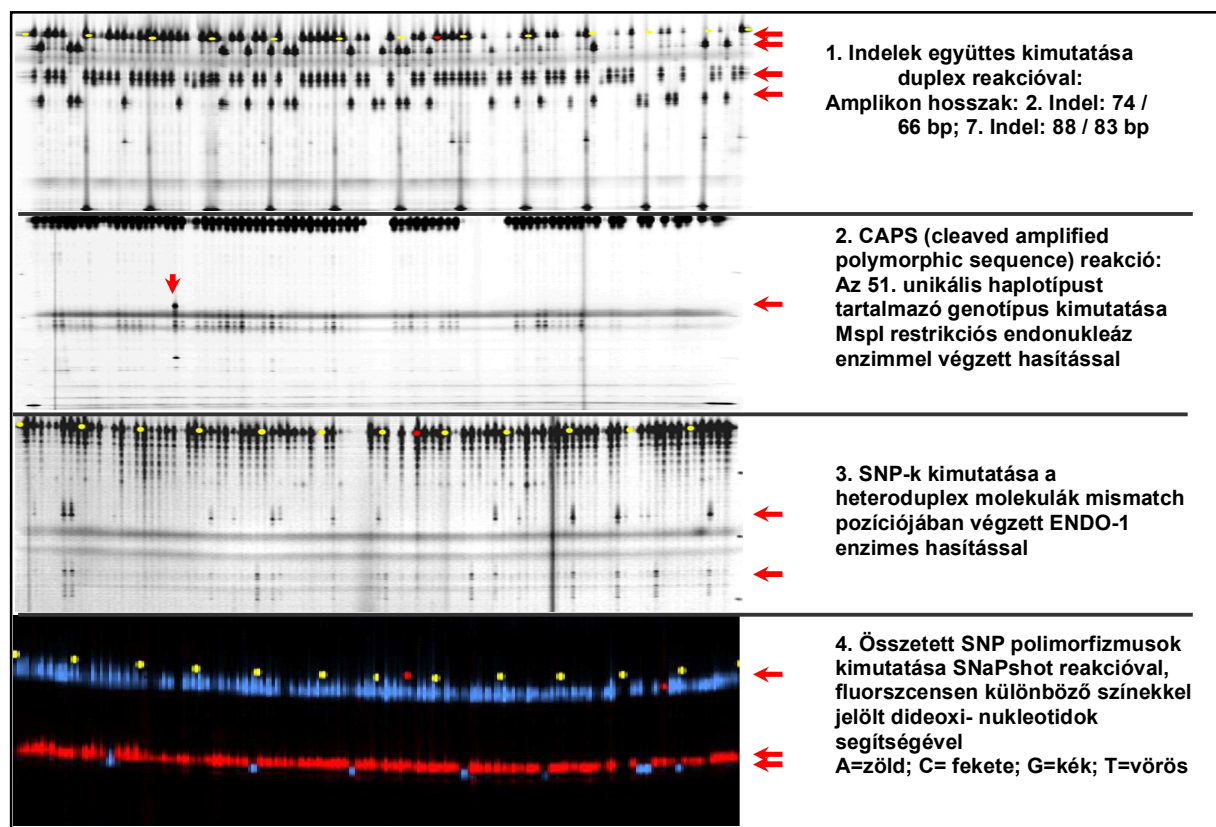


14. ábra: 3 informatív polimorfizmus átkonvertálása könnyen detektálható SSLP markerekké a *HvSRG6* gén esetében.

6.3. Molekuláris markerekkel történő ismételt genotipizálás

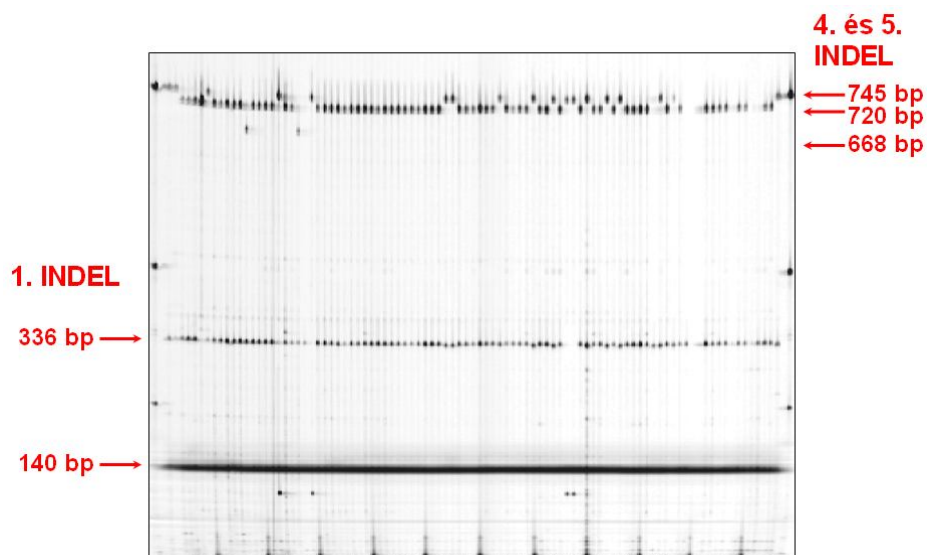
A teljes hosszukban vizsgált génekre (*HvARH1*, *HvSRG6*, *HvDRF1*, *HvA1*) kifejlesztett molekuláris markerek segítségével elvégeztük az EcoTILLING-hez használt 92 genotípust tartalmazó árpa populáció újra genotipizálását. Az ismételt genotipizálás során a detektálás az EcoTILLING-hez használt gélbázisú szekvenáló készüléken történt a termékekbe épített fluoreszcens jelölés segítségével. Céljaink között szerepelt, hogy a

kifejlesztett molekuláris markerek detektálása céljából alkalmazott módszerek a polimorfizmusok jellegéből következő lehetőségekhez képest minél kevesebb lépésben kivitelezhetők, és ennél fogva könnyen reprodukálhatók legyenek. A genotipizálás során használt főbb módszereket a 15. ábra foglalja össze.



15. ábra: A *HvARH1* gén molekuláris markerekkel végzett ismételt genotipizálása során használt módszerek

Az egyes genotípusokat a detektált amplikonoknak, az InDel-ek jelenlététől függő molekulamérete alapján soroltuk haplotípus kategóriákba (16. ábra).



16. ábra: A teljes árpa populáció a *HvSRG6*-os génre kifejlesztett SSLP marker készlet használatával végzett genotipizálásának gélképe.

Az ismételt genotipizálás egyrészt a kifejlesztett haplotípus specifikus markerkészlet tesztelésére szolgált, másrészt lehetőség nyílt az EcoTILLING-gel már vizsgált genotípusok haplotípus besorolásának megerősítésére is.

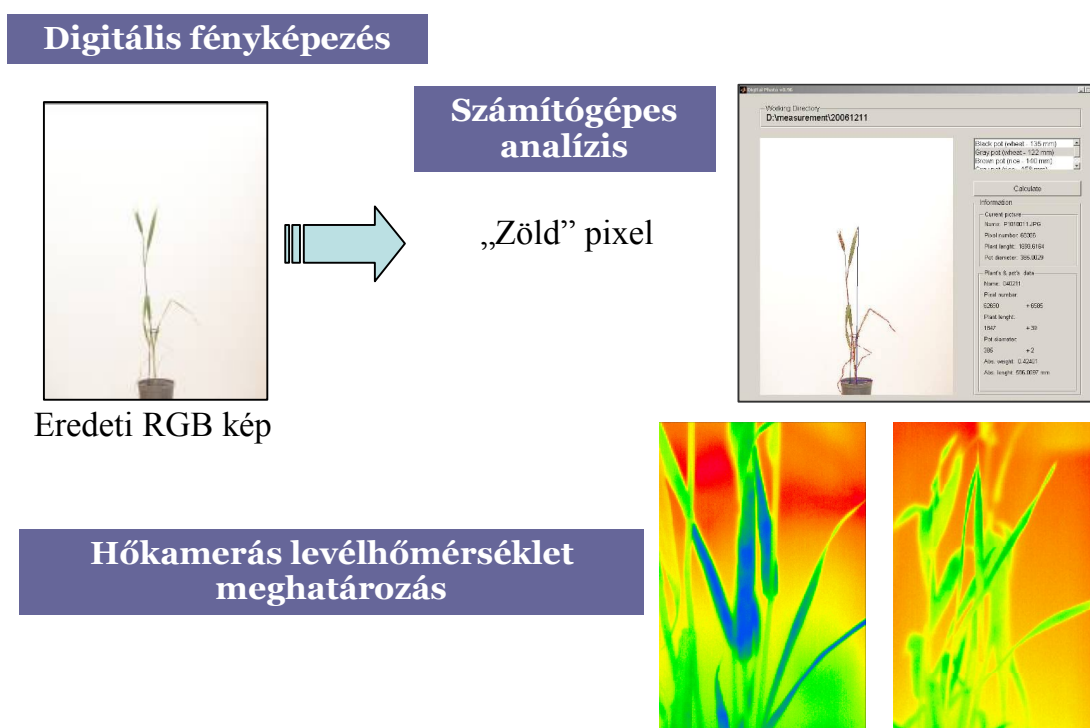
6.4. Variábilis árpa genotípus törzskollekció stressz reakciójának meghatározása és széleskörű fenotípusos jellemzése

Az EcoTILLING analízissel feltárt genotípusos eredmények mellett szükségessé vált a vizsgált árpa vonalak fenotípusos tulajdonságainak, illetve fennálló stressztűrő képességének tesztelése is vízmegvonás mellett.

A szárazságtolerancia szintjének meghatározása érdekében összeállítottunk egy 23 genotíusból álló árpa törzskollekciót, mely részét képezi az EcoTILLING analízishez használt tágabb genotípus kollekciónak. Ezután elvégeztük a kiválasztott 23 árpa vonal (lásd.: anyagok és módszerek 5.3.1.) széleskörű fenotípusos jellemzését, illetve szárazságtoleranciájának tesztjét üvegházi körülmények között Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával a Gabonakutató kht.-vel együttműködésben (17. ábra).



17. ábra: A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszerben vizsgált árpa növények egy héttel a kiültetés után.



18. ábra: A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer működésének sematikus rajza.

Vizsgálataink eredményeként a hagyományos, vizuálisan illetve egyszerű mérések elvégzésével is meghatározható fenotípusos paraméterek mellett (Pl.: érésidő, a termésmennyiség, vagy a harvest index) mellett további értékes kísérleti adatok is a rendelkezésünkre állnak a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer alkalmazásának köszönhetően, melyek közül csupán a legfontosabbak kerülnek az alábbiakban említésre (Lásd: 18. ábra).

6.4.1. A zöldfelület pixel alapú becslése digitális felvételek alapján

A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer félautomata stressz monitorozó egységének részét képező digitális fényképezést végző modul (19. ábra) használata útján minden növényről hetente, 11 szögből készítettünk nagy felbontású digitális felvételeket.



19. ábra: A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer digitális fényképezést végző modulja háttérben a vizsgálat alanyát képző növényvel.

Az egyes növények azonosítása a cserepekre szerelt egyedi digitális azonosító chip-ek segítségével történt. A cserepek mozgatását, illetve a különböző nézetekből történő fényképezéshez szükséges elforgatását szintén a modult vezérlő számítógép végezte a fényképek elkészítésével koordinált módon. A cserepek azonosítása nyomán az adott növényhez tartozó digitális fényképek tárolása szintén automatizált módon zajlott.

A növények relatív pixel alapú zöld felületének meghatározása a digitális fényképeken található zöld színű pixelek száma alapján zajlott azzal a feltételezéssel, hogy ezek az adatok rávilágítanak a zöldtömeg nagyságokra is.

A relatív pixel számot használtuk, mint a zöldfelület jellemzőjét. A kísérlet időtartama alatt rendszeresen rögzített digitális felvételek a kontroll és stressz körülmények között nevelt növények valamennyi fejlődési stádiumáról és a fejlődési dinamikájáról is széleskörű adatokkal szolgálnak.

A 20. ábra felvétele a növények virágzásakor készült. A kép bal oldalán helyezkednek el a stresszelt (20 %-os vízellátású talaj) a kép jobb oldalán pedig a kontroll (optimális: 60 %-os vízellátású talaj) növények. A vízmegvonás hatására bekövetkező zöld biomassza csökkenés jól látható.



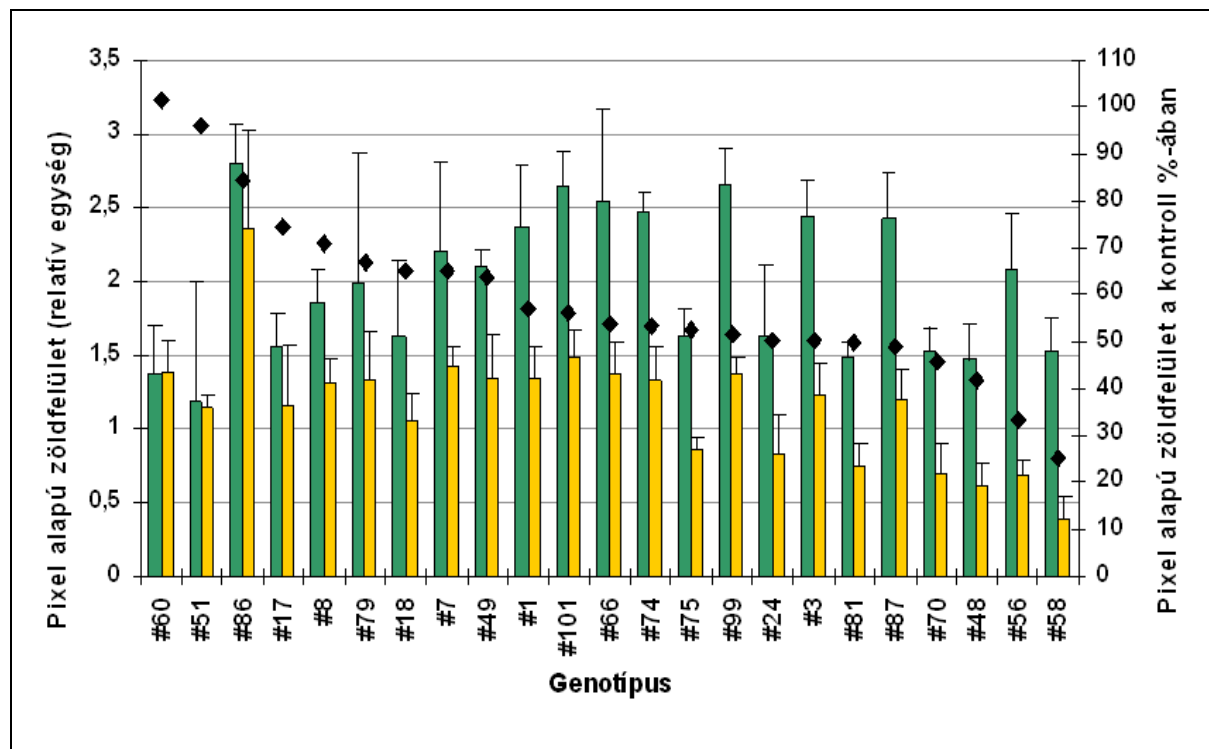
20. ábra: A növények által a virágzás idejére felhalmozott biomassza.

A 21. ábra az egyes genotípusok optimális vízellátás, illetve vízmegvonás mellett nevelt növényeinek a virágzás idején meghatározott pixel alapú zöldfelületének alakulását mutatja, ami információt jelent a biomassza produktumról.

A diagramon az egyes genotípusok a kontrollhoz viszonyított relatív egység, %-ban kifejezett pixel alapú zöldfelületének értékei alapján kerültek rangsorolásra. A rangsor elején található a pixel alapú zöldfelületük magas hányadát szárazság stressz esetén is megőrző genotípusok, míg a rangsor végén a jelentős veszteséggel reagáló árpa vonalak helyezkednek el.

A genotípusok rangsorban elfoglalt helye nem határozza meg önmagában és szükségszerűen a genotípus szárazságtoleranciájának szintjét, hiszen az alábbiakban említésre kerülő harvest indexbeli eltérés jelentős hatással lehet a termésmennyiség kialakulása szempontjából, azaz a biomassza tömegben belüli szemtermés aránya az egyes genotípusok és kísérleti körülmények vonatkozásában is akár jelentősen módosíthatja a biomassza tömeg

változásából adódó hatást. A szemtermés és a pixel alapú zöldfelület közötti korreláció nem tekinthető szignifikánsnak, amelynek értéke: $R^2=0,2637$. Az alacsony mértékű egyezés okai között szerepelhet a vizsgált genotípusok meglehetősen eltérő habitusa.

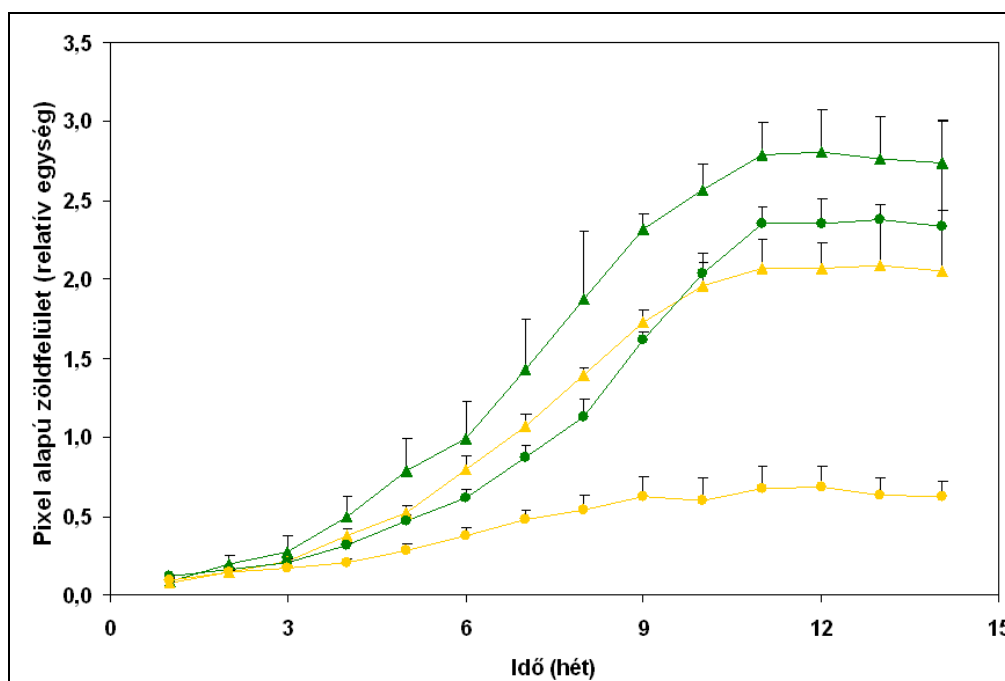


21. ábra: A kísérletbe vont genotípusok relatív pixel alapú zöldfelületének alakulása a virágzás idején 60 %-os (■) és 20 %-os vízellátás (■) mellett, illetve a pixel alapú zöldfelület alakulása a szárazságstressz hatására a kontroll %-ában kifejezve (◆).

A genotípusok rangsorba állításának eredményeként hasonló jelenség figyelhető meg, mint a termés vonatkozásában (lásd később). A rangsor elején elhelyezkedő genotípusok pixel alapú zöldfelületük nagy részét képesek szárazság esetén is előállítani.

Azonban, ha a pixel alapú zöldfelületi adatokat abszolút értékben vizsgáljuk, akkor lényegesen árnyaltabb képet kapunk a toleránsnak tekinthető árpa genotípusok teljesítményéről. Ugyanis ezek a vonalak a legtöbb esetben kontroll körülmények között is csupán közepes mennyiségű pixel alapú zöldfelület előállítására képesek. Ez alól a jelen kollekcióba tartozók közül csupán egy genotípus, mégpedig egy kínai eredetű genotípus a #86 (Fengtien Black) képez kivételt.

A 22. ábra egy, vízhiány esetén zöldtömegének nagy részének elvesztésével reagáló (#56), illetve egy, a zöldtömegének legnagyobb részét megőrző (#86) genotípus relatív pixel alapú zöldfelületbeni növekményét ábrázolja az idő függvényében.



22. ábra: A zöld pixelek alapján számított, relatív egységben kifejezett pixel alapú zöldfelület növekedési dinamikája egy toleráns (#86) 60 %-os vízellátás -▲-; 20 %-os vízellátás -●-; és egy szenzitív (#56) 60 %-os vízellátás -▲-; 20 %-os vízellátás -●-; genotípus életciklusa során.

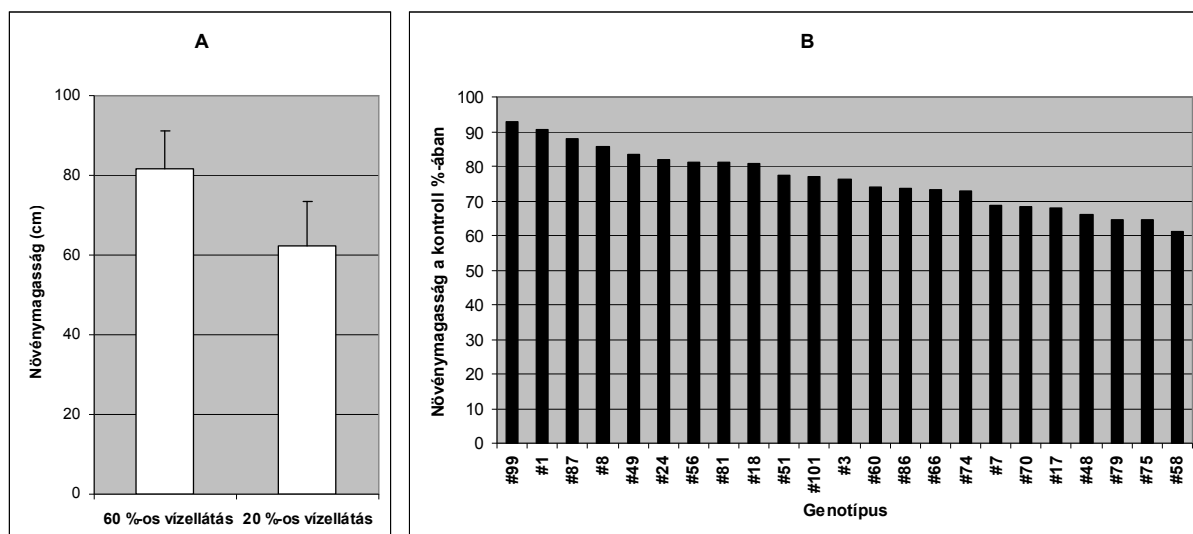
Az összehasonlított genotípusok kontroll körülmények között mért biomassza produkciója mérsékelt eltérést mutat a toleráns genotípus javára. A stresszelt körülmények közötti a pixel alapú zöldfelület produkciót ábrázoló görbék azonban a két genotípus esetében egyre markánsabban elkülönülnek. A szárazság sztreessz hatása az időben előre haladva hatványozottan jut érvényre a biomassza produkcióban is.

A pixelpontok alapján történő zöldfelület becslésről, mint nem invazív, nagy kapacitású eljárásról elmondható, hogy lehetővé teszi a biomassza változásainak alaposabb megismerését, illetve jól alkalmazható a növekedési folyamat időbeni nyomon követésére is. További előnyeként említendő, hogy az elkészült fényképek bármikor visszakereshetők, egyes fiziológiai paraméterek, stressztünetek később is felmérhetők, pontosíthatók.

6.4.2. A növénymagasság változása a szárazság stressz hatására

A növénymagasság tekintetében az általánosan tapasztalt stressz reakció a magasság jelentős mértékű csökkenése volt. Az optimális vízellátás mellett a 23 genotípus átlagos magassága (23. ábra; A. ábrarész) 82,8 cm volt, mely vízmegvonás hatására 62,5 cm-re csökkent. A stressz hatás következményeként tehát átlagosan 23,9 %-os növénymagasság csökkenés volt tapasztalható.

A mért növénymagasság csökkenés nagymértékben genotípus függő volt (23. ábra; B. ábrarész). A magasság csökkenés mértéke 7 % és 39 % között változott. A kontrollhoz viszonyított növénymagasság értékek figyelembevételével felállított genotípus rangsor és a további említésre kerülő meghatározott érték között nem fedezhető fel egyértelmű hasonlóság. A mért növénymagasság és a termésmennyiség értékek kontroll értékhez viszonyított, százalékban kifejezett adatsorai között fennálló korreláció számított értéke mindössze $R^2=0,069$.

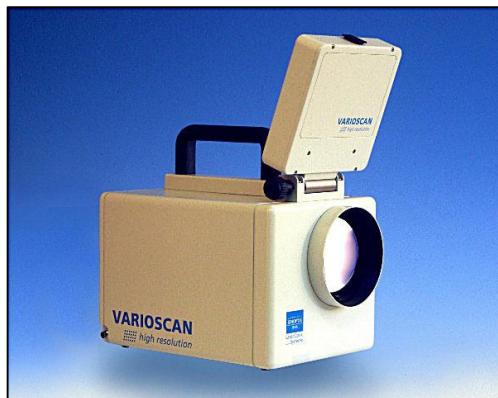


23. ábra: Vízmegvonás hatása a növények magasságának alakulására. A: a 23 genotípus átlagában mért növénymagasság értékek változása a szárazság stressz hatására. B: az egyes genotípusok magasságában a vízmegvonás hatására bekövetkező változás a kontroll százalékában kifejezve.

6.4.3. A transzspirációs aktivitás becslése a felületi levélhőmérséklet méréssel

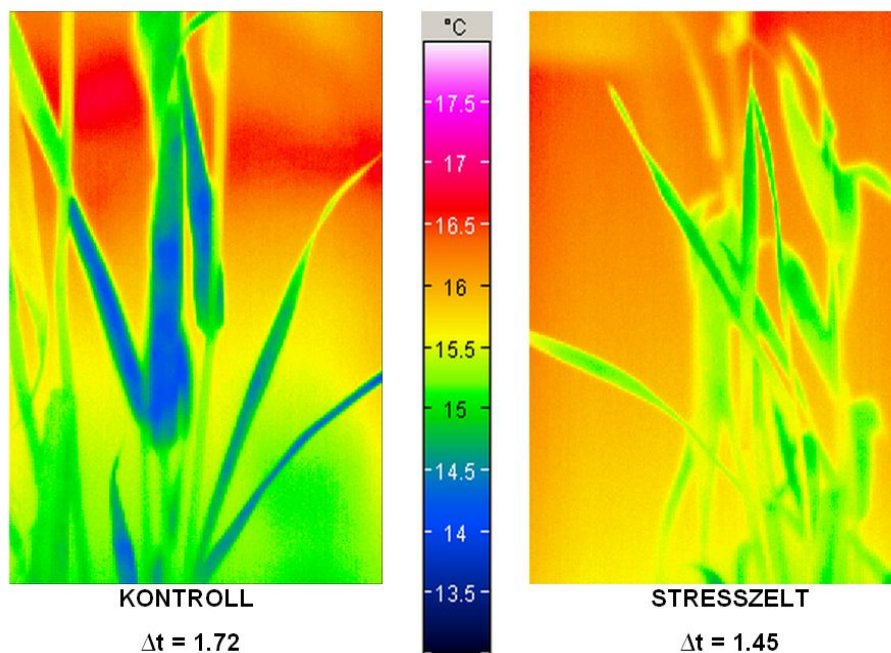
Kísérleteinknek köszönhetően részletes adatsorokkal rendelkezünk a levelek felületi hőmérsékletéről, mely kiértékelése útján meghatározható a genotípusoknak a vízmegvonás

hatására bekövetkező transzspirációs aktivitás vesztese. Méréseinket egy magas érzékenyséű hőkamerával (24. ábra) végeztük, mely lehetővé tette, hogy az eltérő mértékű transzspirációból fakadó kisebb hőmérsékleti különbségeket is detektálni tudjuk.



24. ábra: A levélhőmérséklet meghatározás alkalmával használt VarioSCAN 3021 ST hőkamera.

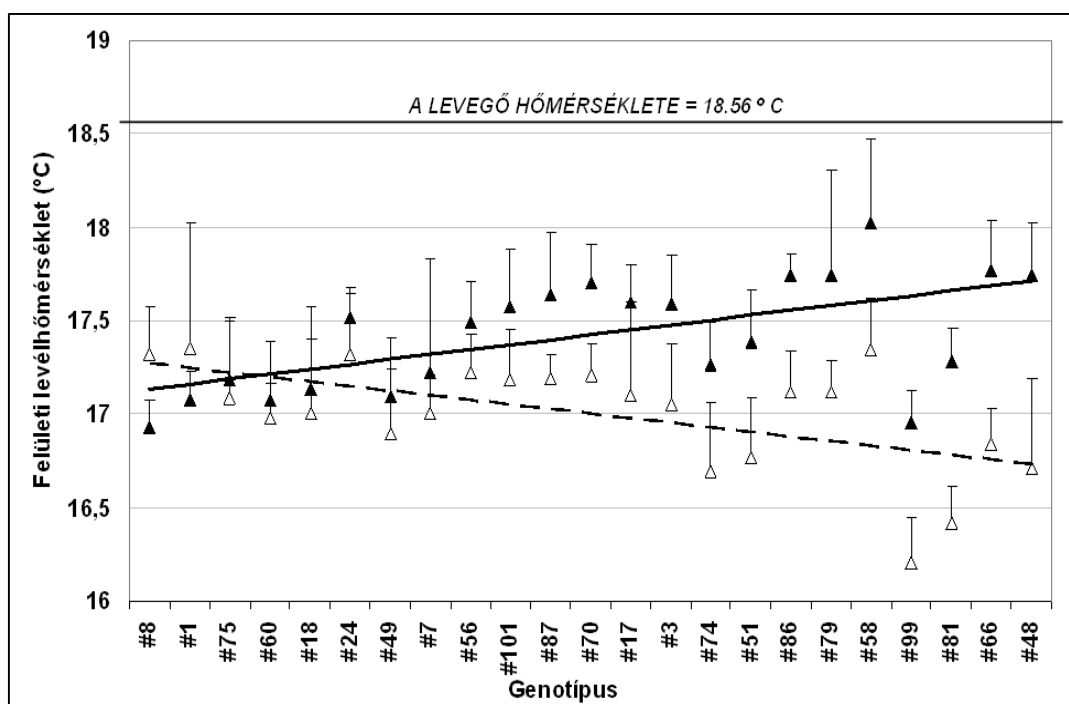
A 25. ábrán egy, a hőmérsékleti skála fokozataihoz rendelt színek segítségével megjelenített hőkamerás felvétel látható kontroll és stresszelt növényekről. A mért levélfelületi hőmérséklet adatokat minden esetben a levegő hőmérsékletéhez viszonyítottuk. Az így kapott Δt érték utal a vizsgált levélfelület transzspirációs aktivitására.



25. ábra: Kontroll (60 %-os vízellátás) és stresszelt (20 %-os vízellátás) körülmények között fejlődő növények leveleinek felületi hőmérséklete a termésképzés időszakában. Az egyes színárnyalatokhoz tartozó, °C –ban kifejezett hőmérsékleti értékeket a képek mellett elhelyezett színskála tartalmazza.

A vízzel megfelelően ellátott kontroll növény esetében mintegy 0,27 °C-kal alacsonyabb levélhőmérsékletet mértünk a vízhiányos körülmények között fejlődő növényhez viszonyítva.

A tesztelt árpa genotípusok transzspirációs aktivitását kifejező levélfelület hőmérsékleti adatok a 26. ábrán kerültek együttesen ábrázolásra. A tesztelt genotípusok a kontroll és a stresszelt kondíciók esetén mért hőmérsékleti érték különbsége alapján, növekvő sorrend szerint kerültek rangsorolásra.



26. ábra: A vizsgált genotípusok -▲- kontroll (60 %-os vízellátás) és -△- stresszelt (20 %-os vízellátás) körülmények között mért levélhőmérsékleti értékei.

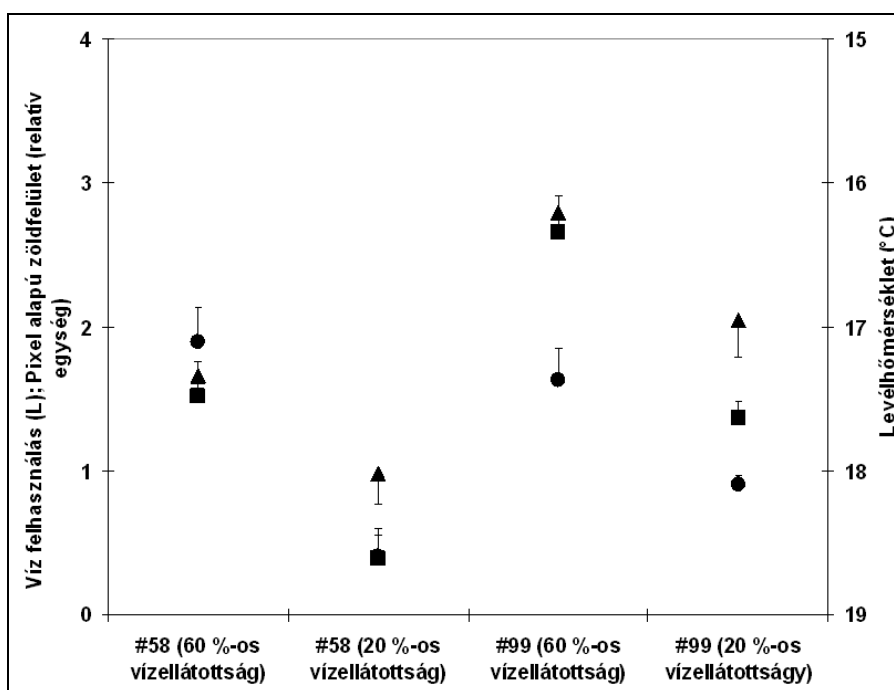
A kísérlet alatt a referenciaként szolgáló léghőmérséklet 18,56 °C volt. A kontroll körülmények között a genotípusok átlagos levélhőmérséklete 17,01 °C; stresszelt körülmények között pedig 17,42 °C volt. A transzspirációs aktivitást tükröző Δt érték összes genotípusra vetített átlaga a kontroll növények esetében $\Delta t = 1,55$ °C, míg a vízhiányos körülmények között élő növények esetében $\Delta t = 1,14$ °C volt.

A kontroll és stresszelt növények Δt értékei közötti eltérés -0,41 °C volt a kontroll növények javára, mely a vízmegvonás hatásának tulajdonítható. A vízmegvonás tehát alapvetően negatív hatást fejtett ki a növények transzspirációs aktivitására. A vízhiány esetén

bekövetkező transzspirációs aktivitásvesztés mértéke tekintetében az egyes vizsgált genotípusok között jelentős különbség volt tapasztalható. Az vizsgált genotípusok eltérő körülmények között mért levélhőmérsékleti értékei közötti eltérést a felvett trendvonalak szemléltetik.

A genotípusok többsége esetében a kontroll növényeknek a sztómákon keresztül zajló gázcserével összefüggésbe hozható párologtatása jelentősen felülmúlta a stresszelt növények ugyanazon paraméterét. Azonban több genotípus (#8, #1, #75, #60, #18, #24, #49, #7) esetében is a jelentős vízmegvonás ellenére is közel azonos levélhőmérsékletet mértünk, amely a gázcseré nyílásokon keresztül végbemenő párologtatás közel azonos mértékére enged következtetni stressz körülmények között is.

Az eltérő levélhőmérsékleti értékekben megnyilvánuló gázcseré intenzitásának az metabolikus aktivitással való összefüggéséről fontos információkkal szolgálhat a növények vízgazdálkodási és biomassa paramétereinek összevetése (27. ábra).



27. ábra: A ▲ levélhőmérséklet, a ■ pixel alapú zöldfelület, illetve a ● vízfelhasználás értékek egy magas (#99) és egy alacsony (#58) transzspirációs aktivitással rendelkező genotípus esetében különböző (60- és 20 %-os) víz ellátottsági szinteken. Az ábra bal oldali skáláján a vízfelhasználás, literben és a pixel alapú zöldfelület, relatív egységben kifejezett értékei találhatóak. A jobb oldali skálán a levélhőmérséklet értékek kerültek ábrázolásra (a tengely az értékeket fordított sorrendben tartalmazza az alacsonyabb levélhőmérséklet értékekhez tartozó fokozott transzspirációs aktivitás szemléltetése érdekében).

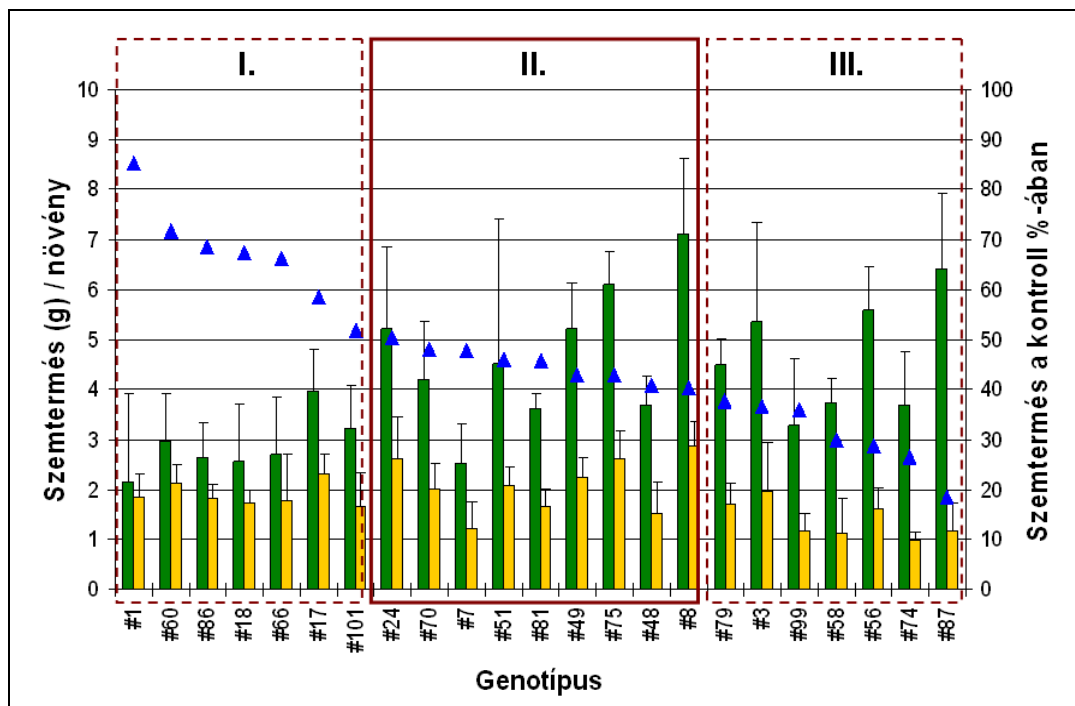
Az összehasonlítás elvégzésére a levélhőmérséklet vonatkozásában eltérő reakciót mutató genotípusokat választottunk ki. Az #58-as genotípus esetében mind optimális vízellátás mellett, mind pedig vízmegvonás esetén viszonylag magas levélhőmérsékleti értékeket mértünk (levélhőmérséklet 60 %-os vízellátás mellett: 17,34 °C; 20 %-os vízellátás mellett: 18,02 °C). A #99-es genotípus esetében pedig mindkét vízellátási szinten viszonylag alacsony levélhőmérsékleti értékeket mértünk (levélhőmérséklet 60 %-os vízellátás mellett: 16,20 °C; 20 %-os vízellátás mellett: 16,95 °C).

Mivel a fokozottabb légcsere aktivitáshoz értelemszerűen alacsonyabb levélhőmérsékleti értékek tartoznak ezért változások iránya ellentétes előjelű a levélhőmérséklet esetében, ezért ezek az értékek fordított (csökkenő) skálán kerültek ábrázolásra.

A levélhőmérséklet mellett ábrázolt további paraméterekhez tartozó adatpontok egymással összhangban változtak a stressz kezelés hatására, mindkét genotípus esetében. Tehát a magasabb levélhőmérsékleti értékekkel jellemezhető kevésbé aktív gázcserét végző növények vízfelhasználása és biomassa produktuma is alacsony szinten maradt. Az aktívabb légcserét folytató, tehát alacsonyabb levélhőmérsékleti értékekkel jellemezhető növények vízfelhasználása és felhalmozott biomassa tömege is magasabb szinten alakult, utalva a fokozottabb légcserével összefüggő magasabb anyagcsere aktivitásra is.

6.4.4. A termésmennyiség változása a szárazság stressz hatására

Elsőként mindenképpen az agronómiai szempontból legfontosabbnak tekinthető paraméter, a szemtermés érdemel említést. A szemtermés adatok cserepenként, azaz növényenként kerültek meghatározásra. A 28. ábra az egyes genotípusok 60 %-os és 20 %-os vízellátás mellett mért terméseredményeit szemlélteti. A diagramon az egyes genotípusok a kontrollhoz viszonyított termésmennyiségük alapján kerültek rangsorolásra.



28. ábra. A szemtermés értékek változása vízmegvonás hatására a vizsgált 23 árpa genotípus esetében (5-5 növény átlagában) 60 %-os vízellátás (■) és 20 %-os vízellátás (■) mellett, illetve a szemtermés alakulása a kontroll értékhez viszonyítva, %-ban kifejezve (▲).

A rangsor elején (I. kategória) helyezkednek el azok a genotípusok, amelyek viszonylag alacsony terméspotenciállal rendelkeznek, de szárazságtoleranciájuk kiváló. Gyakran megfigyelhető, hogy képesek vízhiány esetén előrehozni a virágzást illetve az érést, így lerövidítve életciklusukat. Ebben a csoportba jellemzően egzotikus, erős szárazság stressznek kitett termőhelyekről származó árpa vonalak tartoznak. Az #1-es genotípus például egy Albacete nevű spanyol tájfajta, melyet kifejezetten az ország szárazabb régióiban termesztnek. Ezen fajták habitusukat tekintve számos ősi bélyeget őriznek. Alacsonyabb, fűszerű felépítéssel, kis kalással, viszonylag gyenge bokrosodási képességgel, de az átlagnál jobb biotikus- és abiotikus stressz rezisztenciával rendelkező genotípusok tartoznak ide.

A rangsor végén (III. kategória) helyezkednek el a szenzitívnek tekinthető genotípusok. Ezen fajták termesztési területe többnyire csapadékkal megfelelően ellátott körzetekben található. Ebben a csoportban található például a Keystone (#3) nevű magas, sötétzöld vegetatív részekkel rendelkező igen nagy asszimilációs felületet fejlesztő, kései érésű kanadai intenzív genotípus. Jellemzően nagy zöldtömeggel rendelkező, intenzív termesztéstechnológiát (Pl.: növényvédelem, tápanyagellátás) igényelő genotípusok tartoznak ebbe a csoportba.

Az első két kategóriával szemben az agronómiai szempontból ideálisnak tekinthető tartomány közepén (II. kategória) helyezkedik el. Az ebbe a csoportba tartozó genotípusok kedvező körülmények között kihasználva magas terméspotenciáljukat versenyképes mennyiségű termést adnak. Vízhány esetén pedig képesek minden esetben optimális szinten működtetni az anyagcseréjüket.

Mivel korábban a genotípus kollekció összeállításánál saját eredményekkel nem rendelkezünk, csupán irodalmi adatokra tudunk támaszkodni, annak érdekében, hogy a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszeren tesztelt genotípus kollekció szárazság tolerancia szempontjából megfelelően variábilis legyen. Az említett három csoport együttes jelenléte azonban utal arra is, hogy a fenotipizálási törzskollekciót, illetve a korábban az EcoTILLING analízishez használt teljes genotípuskollekciót is megfelelően állíthattuk össze, azaz alkalmas a szárazságtolerancia feltárására irányuló összehasonlító analízisek elvégzésére.

6.4.5. A növények vízháztartásának paraméterei

6.4.5.1. A vízfelvételi profilok rögzítése

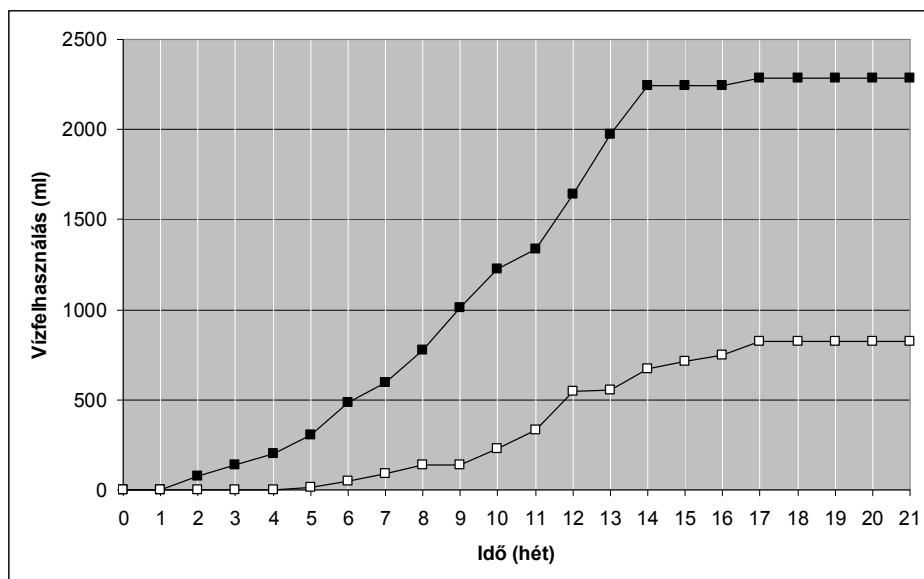
A berendezés öntözést végző eleme alkalmas arra, hogy a fejlődő növények számára a teljes tenyészidőszak alatt állandó talajnedvességet biztosítson (29. ábra). A számítógép által vezérelt öntöző elem automatikusan, tömeg alapján pótolja a növény által felhasznált vízmennyiséget. Az egyedi rádiófrekvenciás chipekkel végzett azonosítás után regisztrálja az utánpótlott vízmennyiség értékeket valamennyi növény esetében. Ezen adatok összesítéséből kalkulálható a növény adott időponthoz kötődő illetve összesített vízfelhasználása is. Ezen kívül a berendezéshez kapcsolt számítógép elvégzi a növények vízfelhasználásának folyamatos regisztrálását és az adatok tárolását is. A vízfelvételi adatok a hetente végzett öntözések alkalmával kerültek rögzítésre. A kísérletek jelenlegi elrendezésében nem vettük figyelembe a talajon keresztül elpárolgott víz mennyiségét.



29. ábra: A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer, öntözést végző eleme működés közben. A növények öntözését egy perisztaltikus pumpával végző számítógép a szintén hozzá kapcsolt mérleg segítségével kalkulálja, és pótolja a legutóbbi öntözés óta a növény által felvett vízmennyiséget.

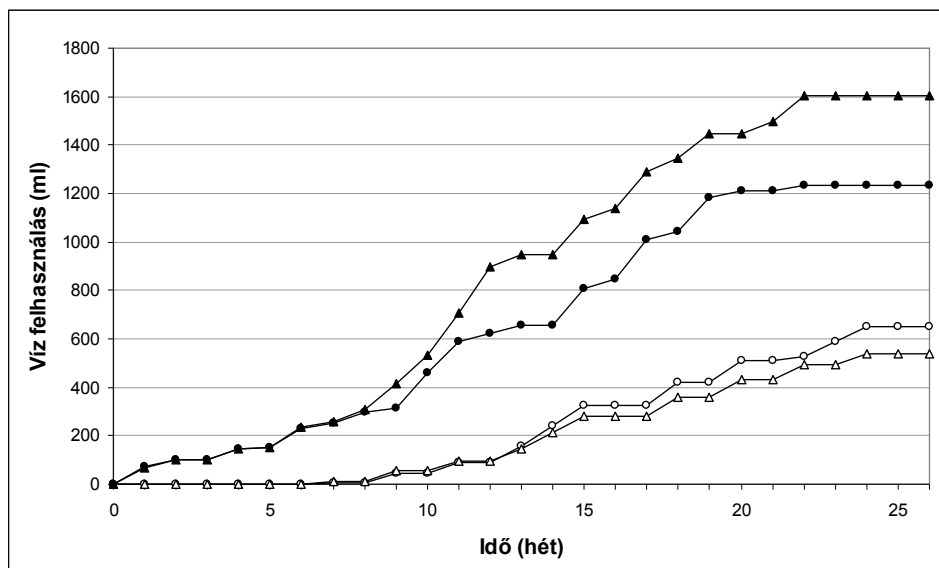
6.4.5.2. A regisztrált vízfelhasználási profilok meghatározása

A teljes tenyészidőszak alatt regisztrált adatokból meghatározásra kerültek az egyes növények vízfelvételi profiljai. A 30. ábra a tesztelt genotípusok átlagában az idő függvényében mért vízfelvételi görbéket hivatott megjeleníteni kontroll és stressz körülmények között. Az optimális vízellátottságú növények a teljes tenyészidőszak alatt 2285 ml vizet használtak fel, az alacsony víz ellátottsági szinten fejlődő növények teljes vízfelhasználása ennek az értéknek csupán a 36 százaléka: 822 ml volt. A kontrollként szolgáló illetve a vízmegvonásnak kitett növények vízfelhasználásának időfüggését leíró görbék lefutása trendjében hasonlóknak mondható, meredekségében azonban jelentős eltérést mutat. A növények fejlődésével a kontroll növények vízfelhasználási görbéje fokozatosan elválzik a stresszelt növények vízfogyasztását leíró görbétől. A kontroll növények idő függvényében dinamikusan fokozódó vízfelhasználásának háttérében valószínűleg a magasabb felhalmozódó biomassza felépítése majd fenntartása okán megnövekvő igények fedezésére szolgáló emelkedett vízigény áll.



30. ábra: A genotípusok átlagában meghatározott, kumulált vízfelhasználási profilok alakulása 60 %-os (■) és 20 %-os vízellátás (□) mellett.

A 31. ábra a vízmegvonás hatására bekövetkező szemterméskiesés tekintetében legtoleránsabbnak (Albacete) és legérzékenyebbnek (Arda) bizonyult árpa genotípus vízfelvételi görbéjét hivatott megjeleníteni.



31. ábra: Vízfelvételi profilok az idő függvényében egy toleráns (Albacete) 20 %-os vízellátás -○-; 60 %-os vízellátás -●- és egy szenzitív genotípus (Arda) 20 %-os vízellátás -△-; 60 %-os vízellátás -▲- esetében.

A növények fejlődésének kezdeti szakaszán (kb. az 1.-től a 8. hétig) az optimális vízellátottságú növényekre mérsékelt vízfelvétel volt jellemző, a stresszelt növények esetében ezen időszak alatt nem történt vízutánpótlás a kísérlet szempontjából szükséges, 20 %-os talajnedvesség szint elérése érdekében.

Az intenzív fejlődés időszakában (kb. 8. és a 20. hét között) mind a toleráns mind pedig a szenzitív genotípus esetében a növények vízfelvétele nagyobb volt. Ez, a vízfelvételi görbe közepén elhelyezkedő lineárisnak tekinthető szakasz mindkét genotípus esetében trendjében hasonló, csupán meredekségbeli eltérés figyelhető meg. Optimális körülmények között (60 %-os vízellátás mellett) a szenzitív (Arda) genotípus nagyobb vízszükségletének fedezésére több vizet használt fel a szenzitív genotípushoz viszonyítva. Ez vízfogyasztásbeli többlet a termés hozamában is megmutatkozott (Lásd: 28. ábra).

Vízmegvonás esetén viszont mindkét genotípus közel azonos mennyiségű vizet használt fel életfolyamatai működtetésének ellátásához. Azonban a genotípusok termésképzésének hatékonysága között már jelentős mértékű eltérés mutatkozott, ugyanis a termés tekintetében szárazságtűrőnek mutakozó genotípus (Albacete) közel hasonló vízfelvétel mellett lényegesen magasabb szemtermést produkált.

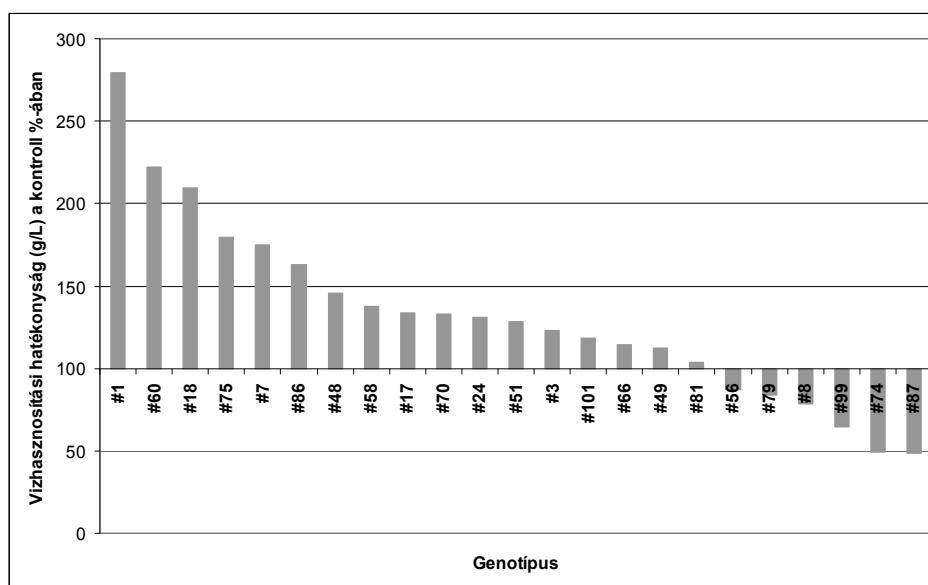
A fentiek értelmében kijelenthető tehát, hogy a vízfelvétel profil önmagában nem tükrözi az adott genotípus szárazság toleranciájának szintjét. Ennek a paraméternek az ismerete tehát szükséges, de nem elégséges feltétele egy genotípus szárazságtoleranciájának megítéléséhez.

6.4.5.3. Vízhatszósítási hatékonyság alakulása a szárazságstressz hatására

Ahhoz, hogy a növény vízhatszósításáról megfelelő és a valóságot tükrözö átfogó képet kapjunk szükséges volt meghatározni a genotípusok vízhatszósítási hatékonyságát. Ezen paraméter pontos értelmezésére többféle definíció, meghatározására pedig számos metóduş létezik. Jelen esetben ez a paraméter az egységnyi víz felhasználásával képzödütt szemtermést jelenti. A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatának köszönhetően a növényenkénti teljes tenyészidőszak alatti vízfelhasználás és a termés mennyiség ismeretében viszonylag egyszerűen kalkulálható ez az érték.

A 32. ábra az optimális vízellátás mellett nevelt kontroll növényekhez viszonyított, vízmegvonás hatására bekövetkező vízfelhasználási hatékonyság változást szemlélteti %-os értékben kifejezve.

Mivel ez a paraméter nem más, mint az eddig ismertett két tulajdonság (szemtermés; vízfelhasználás) értékének a hányadosa, így nem meglepő, hogy az egyes tulajdonságok szerint felállított rangsorok között hasonlóságok fedezhetők fel (többek között a rangsorban első (Albacete) és utolsó (Arda) pozícióban található genotípusok tekintetében).

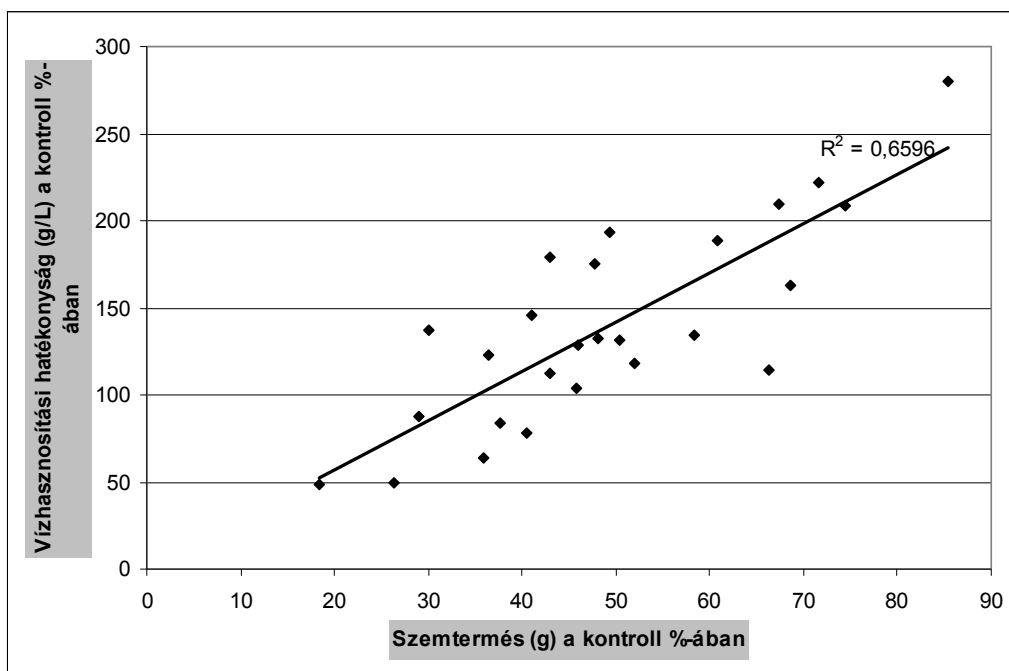


32. ábra: A vizsgált genotípusok vízhasznosítási hatékonyságának alakulása szárazság stressz hatására

6.4.6. A szemtermés és a vízhasznosítási hatékonyság közötti korreláció

A szemtermés és a vízhasznosítási hatékonyság vízmegvonás hatására bekövetkező változásának együttes kiértékelésével és ábrázolásával derült fény a két paraméter közötti összefüggésre. A két paraméter vízhiány esetén bekövetkező alakulását a 33. ábra szemlélteti, mely a szemtermés és a vízhasznosítási hatékonyság százalékban kifejezett értékei közötti jelentős mértékű korrelációról ($R^2=0,6596$) tanúskodik.

Ez a fontos összefüggés egyben megerősíti vízhasznosítási hatékonyság kiszámításához szükséges mindkét paraméter pontos meghatározásának és számszerűsítésének szükségességét, ezáltal rámutatva a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer víz utánpótlást regisztráló elemének használatából fakadó előnyökre.

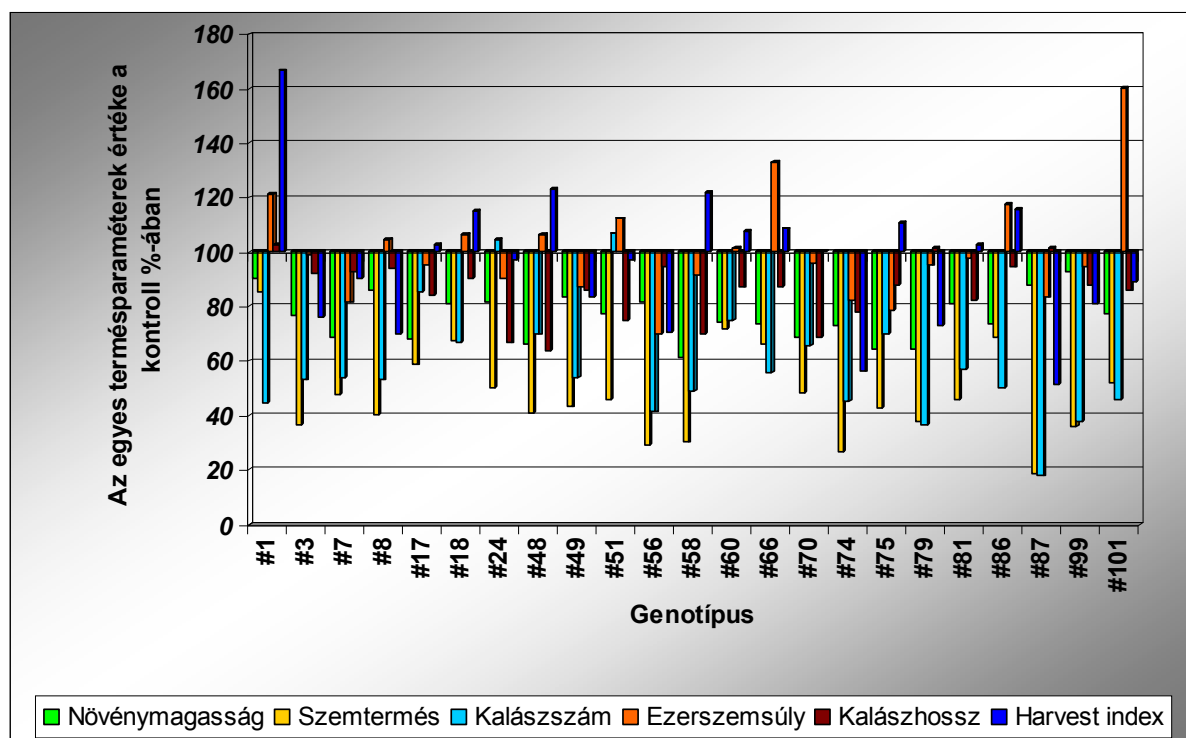


33. ábra: A vízhasznosító képesség és a termőképesség vízmegvonás hatására bekövetkező változása közötti összefüggés.

6.4.7. További fontos mért paraméterek alakulása szárazság stressz hatására

A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszerben tesztelt genotípusok főbb termésparamétereinek összesítése (34. ábra) nyomán megállapítható, hogy az általánosan tapasztalt stressz reakció az egyes mérhető paraméterek értékeinek változó arányú és mértékű visszaesése. Ez a csökkenés azonban genotípusonként mértékében és az egyes főbb termésparaméterek közötti arányokban is jelentős eltéréseket mutat.

A vízmegvonás következményeként bizonyos genotípusok egyes termésparamétereiben pozitív irányú eltéréseket is tapasztaltunk a kontroll növényekhez viszonyítva. A kontroll értékhez viszonyított termésmennyiség alapján felállított rangsorral (lásd: 28. ábra) összehasonlítva az ábrát szembetűnő, hogy a rangsor első harmadában (I.) található genotípusok (#1, #60, #86, #18, #66, #17, #101) esetében egy vagy több paraméter vonatkozásában pozitív irányú változás állt be a szárazság stressz következtében. Jelentősnek tekinthető emelkedés elsősorban a harvest index illetve az ezerszemsúly tekintetében figyelhető meg. Mindkét termésparaméter esetében mértünk 50 % körüli növekedést.



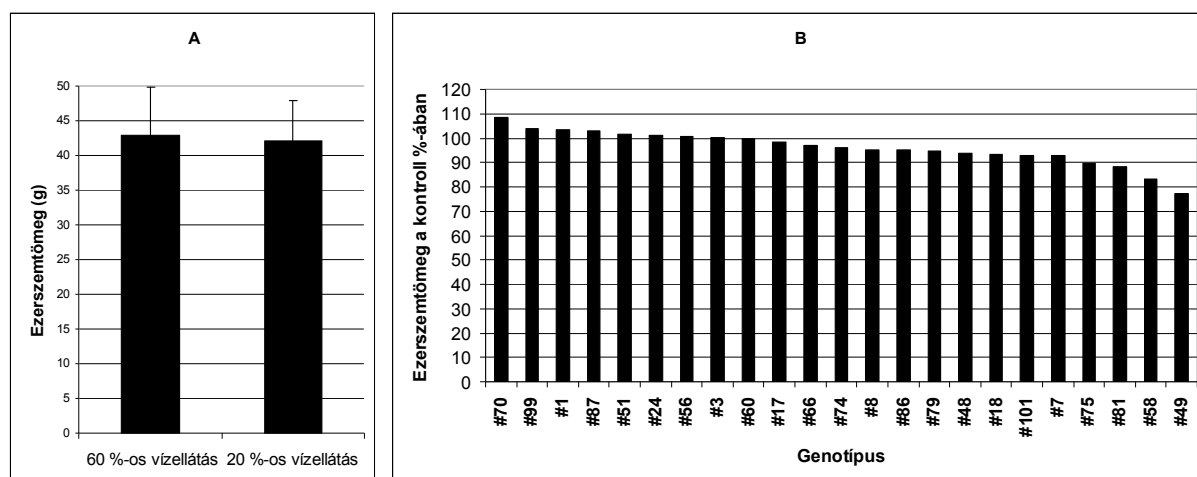
34. ábra: A mesterségesen előidézett szárazságstressz hatása a főbb agronómiai paraméterek értékeire a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszerben

6.4.7.1. A szárazság stressz ezerszemsúly változására kifejtett hatására

Az ezerszemsúly a terméshozam mellett az egyik legfontosabb figyelembe vehető paraméter a gabonafélék esetében. A vízhiány ezen paraméterre gyakorolt hatása általában látványos, illetve kísérleti rendszertől függetlenül könnyen meghatározható. A tesztelt 23 genotípus átlagában (35/A. ábra) vizsgálva az ezerszemsúly alakulását csupán kismértékű, majdnem hibahatáron belüli csökkenés tapasztalható. A 60 %-os vízellátás (42,92 g) és 20 %-os vízellátás (42,17 g) esetén mért ezerszemsúly mindössze 1,75 %-os eltérést mutat a kontroll növények javára.

Az egyes genotípusokra lebontott értékek (35/B. ábra) azonban már nagyobb eltéréseket mutatnak egymáshoz viszonyítva. A vizsgált genotípusok a szárazságstresszre az ezerszemsúly tekintetében eltérő válaszreakciót mutattak. A kontroll növényekhez viszonyított, százalékban kifejezett értékek 77 % és 108 % között változnak. Bizonyos genotípusok a jelentős termésdepresszió ellenére is ezerszemsúly növekedéssel reagáltak a szárazságstresszre. Azonban az egyes genotípusok ezerszemsúly értékeinek alakulásában a tulajdonság kialakulásában résztvevő genetikai faktorok mellett más tényezők is szerepet

játszhattak. Az ezerszemsúly csökkenése ellen ható több genotípus esetében is tapasztalt tényező volt a megtermékenyülési problémák miatt hiányosan kitelt kalászból adódó csökkent szemszám. Az ezerszemsúly csökkenése irányába pedig az egyes genotípusokra jellemző bokrosodás miatti eltérő számú sarjhajtások jellemzően kisebb ezerszemsúlyú termésének jelenléte hatott.



35. ábra: Vízmegvonás hatása az ezerszemsúly értékének változására. A: a 23 genotípus átlagában mért ezerszemsúly változása a szárazság stressz hatására. B: az egyes genotípusok ezerszemsúlyában vízmegvonás hatására bekövetkező változása a kontroll százalékában kifejezve.

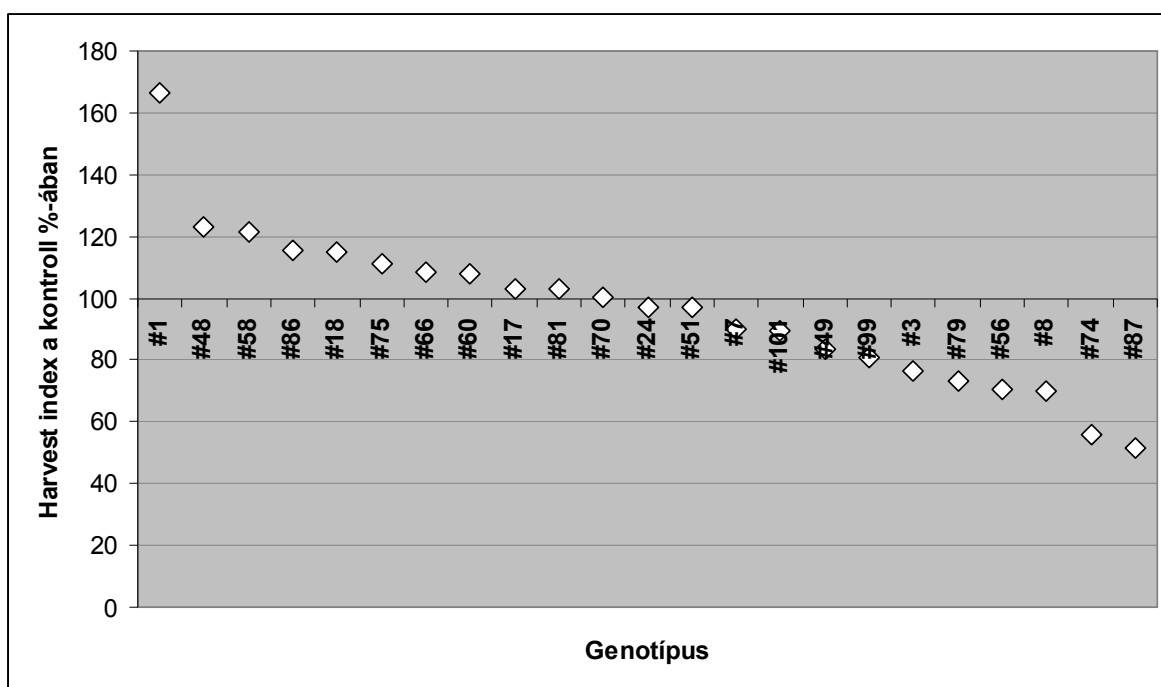
6.4.7.2. A harvest index alakulása vízmegvonás esetén

A szárazságstressz hatására a biomassa produkción belül a szemtermés részarányának alakulása változatos képet mutatott (36. ábra). A vizsgált genotípusok egy részénél a tapasztalt stresszreakció a harvest index csökkenése volt.

Ezen genotípusoknál a vízhiány következtében kialakuló víz- és tápanyag felvételi nehézségek hatása a termésképzés tekintetében magasabb szinten nyilvánult meg, mint a vegetatív részek esetében. Ez megfigyeléseink szerint elsősorban megtermékenyülési problémákra, illetve a már kialakult növényi szervek korai szenescenciájára vezethető vissza.

A tesztelt genotípusok közül 11 vonal harvest indexe a termésképzés szempontjából kedvező irányban változott a vízmegvonás hatására. Azaz a vizsgált árpa vonalak közel fele csökkent tápanyag- és vízfelvételi források esetén is képes volt anyagcseréjének optimalizálása útján a kontroll viszonyoknak megfelelő, vagy azt meghaladó arányú termés tömeg előállítására.

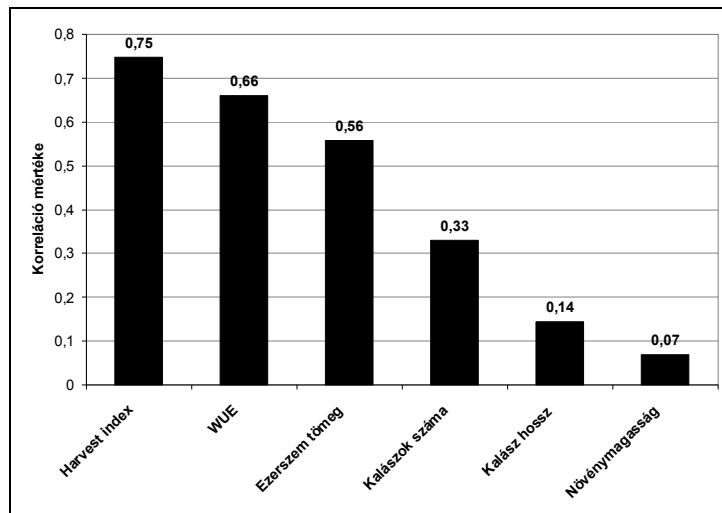
Utóbbi reakcióra látványos példát szolgáltatott a termésmennyiség és a vízhasznosítási hatékonyság szempontjából is kiemelkedő teljesítményt nyújtó, #1 genotípusként szereplő, Albacete (#1) elnevezésű, Spanyolországban termesztett tájfajta, amely a harvest index tekintetében is figyelemre méltó eredményt produkált. A szemtermés földfeletti részekhez viszonyított arányát vízmegvonás esetén mintegy 67 % -kal volt képes növelni.



36. ábra: A számított harvest index kontrollhoz viszonyított, %-ban kifejezett értékének alakulása szárazságstressz hatására a tesztelt 23 árpa genotípus esetében.

6.5. A fontosabb fiziológiai és agronómiai paraméterek közötti korreláció

A legfontosabbnak tekintett paraméter, a szemtermés illetve az azt közvetlenül meghatározható vagy számított fontosabb paraméterek közötti összefüggést jeleníti meg a 37. ábra.



37. ábra: A korreláció mértéke a szemtermés és az egyes fiziológiai és agronómiai paraméterek között. A termésparaméterekhez tartozó oszlopok felett a számszerűsített korreláció értékek kerültek feltüntetésre.

Az adatok a vizsgált 23 genotípus (230 növény) egyes értékeinek összesítéséből születtek. A számítások alapjául az egyes paraméterek kontroll értékhez viszonyított, a szárazság stressz hatására bekövetkező változásai szolgáltak.

A termőképességgel összehasonlítva viszonylag magas korrelációt találtunk a harvest index, a vízhasznosító képesség (WUE) valamint az ezerszeműség tekintetében. Míg a növénytörzs, a kalázhossz, illetve a bokrósodás mértékének jelzőszámú szolgáltató növényenkénti kalákszám esetében nem volt kimutatható jelentős mértékű korreláció.

6.6. Az EcoTILLING módszerrel feltárt haplotípus adatok illetve a szárazságstressz alatt mért fenotípusos paraméterek közötti kapcsolat

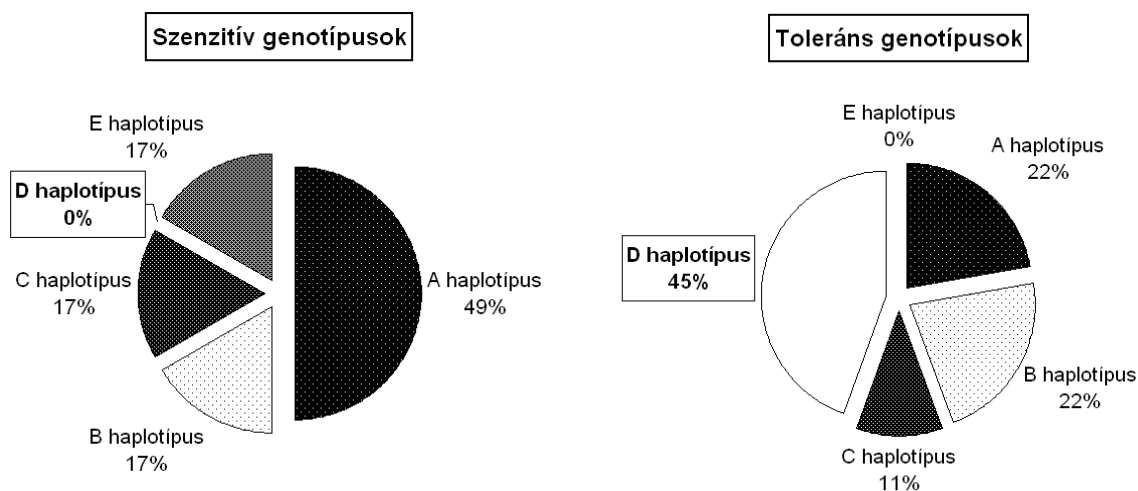
A genotípusos és fenotípusos adatok teljeskörű kiértékelését követően kapcsolatokat kerestünk az EcoTILLING analízis útján feltárt, a szárazság tolerancia kialakításában potenciálisan részt vevő gének azonosított haplotípusai valamint a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszerben meghatározott, a szárazságtűréssel összefüggésbe hozható fenotípusos tulajdonságok között. A vizsgált génjelöltek genetikai variabilitási adatai birtokában a megkíséreltük a széleskörűen meghatározott fenotípusos, elsősorban agronómiai paraméterekhez rendelni az elkülönített haplotípusokat.

A genotípusos és a fenotípusos adathalmazok összehasonlíthatósági feltételeinek megteremtése érdekében -fenotipizálási kísérletből nyert adatok metrikus volta miatt-

szükségessé vált a vizsgált genotípusok egyes meghatározott paraméterek szerinti történő rangsorba állítása illetve kategóriákba sorolása. A fenotípus tekintetében is jellemzett árpakollekció méretét, valamint az egyes haplotípusok gyakran nagymértékben eltérő arányát figyelembe véve valamennyi esetben két (egy „szenzitív” és egy „toleráns”) fenotípus kategóriába soroltuk a vizsgált genotípusokat. Eközben tudatában voltunk annak, hogy a csoportosítás bizonytalansággal is terhelt.

6.6.1. A *HvA1* gén haplotípusainak és a pixel alapú zöldfelület kapcsolata

A *HvA1*-es gén esetében a 60 %-os és 20 %-os vízellátottsági viszonyok között mért pixel alapú zöldfelület eltérések alapján rangsorolt genotípusokat értékelve találtunk jelentős mértékű haplotípus-fenotípus összefüggést (38. ábra). A szenzitív és toleráns genotípusokat elkülönítő választóvonal kijelölését a stressz okozta gátlás mértéke alapján végeztük. Amennyiben a csökkenés a kontroll értékhez viszonyítva 55 %-nál nagyobb volt, azt a genotípust szenzitívnek tekintettük. A rezisztens genotípusok esetében a vízmegvonás okozta gátlás 55 %-nál kisebb volt a normál körülmények között nevelt növényekhez hasonlítva. A két kategória elkülönítésénél figyelembe vettük a határvonal közelében lévő genotípusok egyéb stressz paramétereit is. A *HvA1* gén EcoTILLING analízise eredményeként 5 unikális haplotípus (A-E) vált ismertté. Az A, a B és a C haplotípus mindkét csoportban megtalálható. Az E haplotípus csak a szenzitív genotípusokban van jelen, 17 %-os gyakorisággal, míg a D-haplotípust hordozó genotípusok pixel alapú zöldfelület eredményeik alapján minden esetben a toleráns kategóriába kerültek. Ezen csoporton belül a D-haplotípus aránya eléri a 45%-ot.



38. ábra: A *HvA1* gén egyes haplotípusainak százalékban kifejezett előfordulási gyakorisága a tesztelt árpa törzskollekció toleráns és szenzitív genotípusainak csoportjában.

Annak tisztázása érdekében, hogy állhatnak-e szekvencia eltérések a különböző haplotípus arányok, illetve a különböző haplotípusokat hordozó genotípusok eltérő stresszreakciójának hátterében, összeállítottuk a *HvA1* gén haplotípus táblázatát (8. táblázat). A *HvA1* gén 919 bp hosszúságú amplikonjában elkülönített haplotípusok szekvenciáinak összevetése nyomán 12 SNP valamint 2 InDel típusú polimorfizmus jelenlétére derült fény. Mindkét InDel kódoló régióban található. A 1.I jelölésű, 33 bázispár hosszúságú génszakasz csupán a szenzitív genotípusokban kizárólagos előfordulású E haplotípusban deletálódott. A 2.I jelölésű 3 bázispárnyi szakasz pedig csak a toleráns genotípusok körében megtalálható D haplotípusban volt kimutatható. Az 1.I mutáció 11 aminosavnyi fehérje szakasz kiesésével járt, a 2.I mutáció pedig 1 aminosav fehérje láncba épülésével hozható kapcsolatba. A detektált 12 SNP közül 6 található exonikus régióban, ezek közül pedig 5 idézett elő aminosav cserével járó változást a génről keletkező fehérje termékben.

8. táblázat: A *HvA1* génben azonosított haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusokat és főbb jellemzőiket tartalmazó áttekintő táblázat.

	1.S	2.S	3.S	4.S	5.S	6.S	7.S	8.S	1.I	9.S	10.S	11.S	12.S	2.I
Szekvencia (adatbázis)	G	A	G	C	C	G	C	G	33bp	G	G	G	G	---
A haplotípus	G	A	G	C	C	G	C	G	33bp	G	G	G	G	---
B haplotípus	G	A	G	C	T	G	C	G	33bp	G	G	A	A	---
C haplotípus	C	A	G	T	T	A	G	C	33bp	G	G	G	A	---
D haplotípus	C	A	C	T	T	A	G	C	33bp	C	G	G	A	CCA
E haplotípus	A	G	G	T	T	A	G	C	---	-	A	A	A	---
Nukleotid csere	G/C/A	A/G	G/C	C/T	C/T	G/A	C/G	G/C	33 bp/-	G/C	G/A	G/A	G/A	-/CCA
Exon/intron	I	I	I	I	I	I	E	E	E	E	E	E	E	E
Aminosav csere	Q/D	Q/D	11aa	Q/H	A/T	T/T	A/T	-/T

A génekhez tartozó haplotípus táblázatokban használt rövidítések:

Polimorfizmusok: S = SNP; I = InDel

Nukleotidok: A = adenin; C = citozin; G = guanin; T = timin

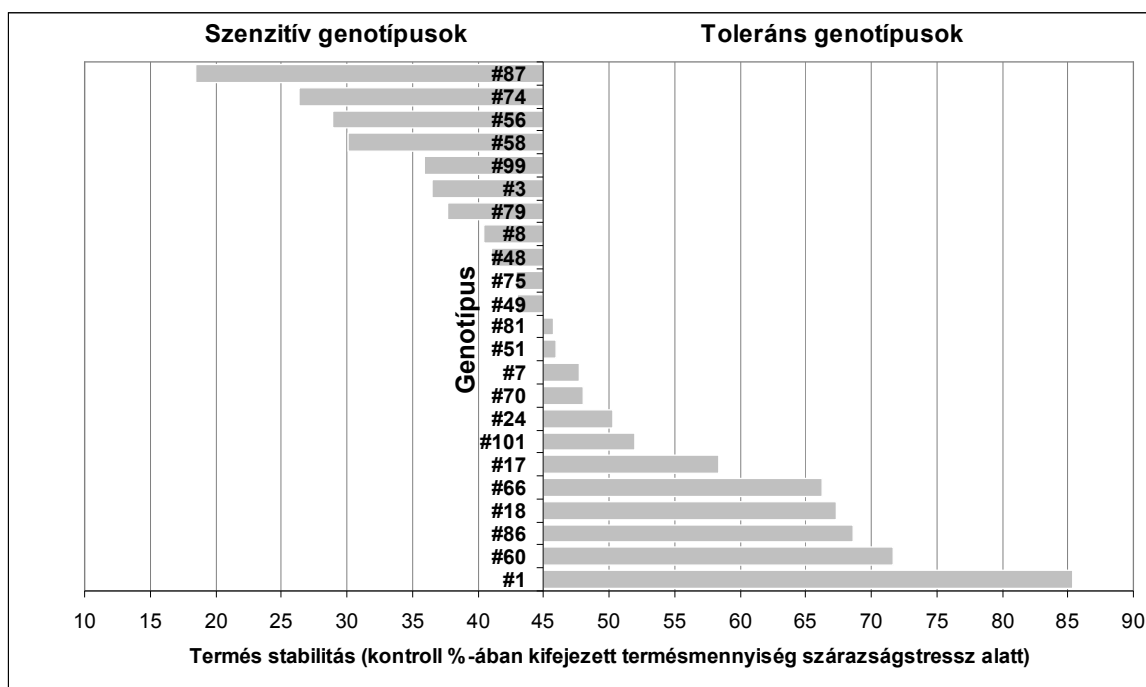
E = exon; I = intron

Aminosavak: A = alanin; R = arginin; N = aszparagin; D = aszparaginsav; C = cisztein; Q = glutamin; E = glutaminsav; G = glicin; H = hisztidin; I = izoleucin; L = leucin; K = lizin; M = metionin; F = fenilalanin; P = prolin; S = serin; T = threonin; W = triptofán; Y = tirozine; V = valin

6.6.2. A termés stabilitással összefüggésbe hozható haplotípus-fenotípus kapcsolatok

A tesztelt genotípusok termésmennyiségéből levezetett szárazságtűrését legpontosabban kifejező paraméter a vízmegvonás esetén mért, a kontroll százalékában

kifejezett termésmennyiség. Az ezen érték alapján rangsorba rendezett genotípusokat (39. ábra) szenzitív illetve toleráns kategóriákba soroltuk, melyek között a határt a kontroll értékhez viszonyított szemtermés 45 %-os értékénél húztuk meg. A két kategóriába így közel azonos számú genotípus került. A kategóriák közötti határvonal kijelölése a fent említett praktikus okokból szükséges volt, azonban mivel a genotípusok között e paraméterében élesen elkülöníthető határ nincs, ezért a kategóriahatárok kijelölésekor az átmenetet képező genotípusok más stressz mutatóit is figyelembe vettük.

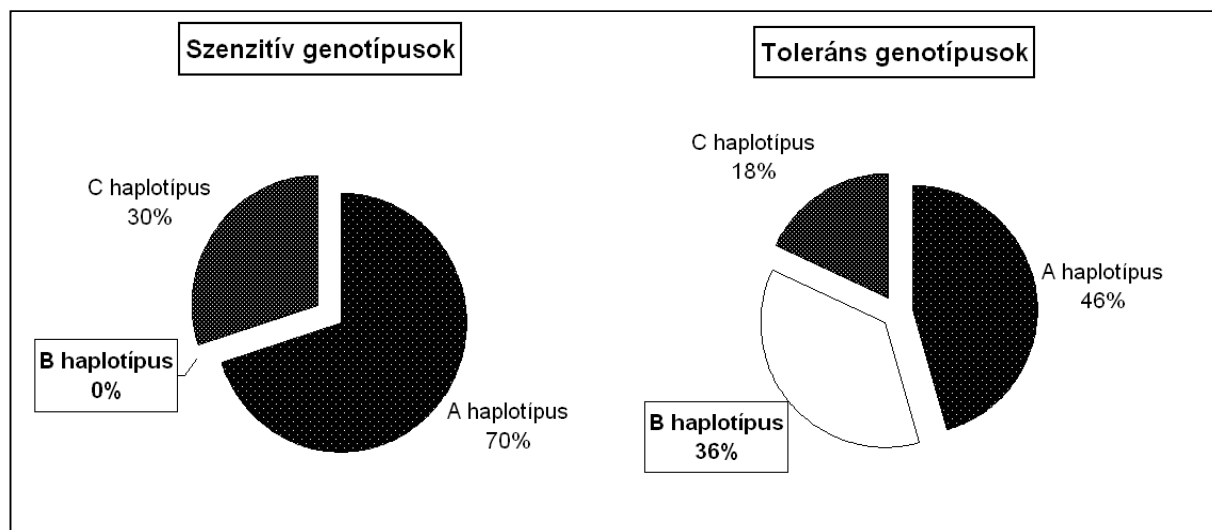


39. ábra: A tesztelt genotípusok termés-stabilitás szerint felállított rangsora alapján kialakított szárazságtűrési vonatkozásában „szenzitív” és „toleráns” kategóriák

Következő lépésként megvizsgáltuk a szárazság érzékenységi kategóriákba sorolt genotípusok EcoTILLING analízissel jellemzett, szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltekben megtalálható haplotípus arányokat. A fenotípusosan tesztelt törzskollekció szenzitív és toleráns részkollekciójában található haplotípus frekvenciákat összehasonlítva két génben (*HvDRF1*; *HvNHX1*) találtunk szignifikánsnak nevezhető genotípus-fenotípus kapcsolatot.

6.6.2.1. A *HvDRF1* gén haplotípus-termésstabilitás összefüggése

A *HvDRF1* gén C-amplikonjának EcoTILLING analízissal, és szekvenálással elkülönített haplotípusainak előfordulási gyakoriságában jelentős eltérést tapasztaltunk a fenotípusosan tesztelt árpa törzskollekció toleráns és szenzitív genotípusai között (40. ábra). A polimorfizmus összetétel alapján elkülönített 4 unikális haplotípus kategória (A, B, C és D haplotípus) közül a szenzitív genotípusokban kettő fordult elő: az A haplotípus 70 %-os gyakorisággal, a C haplotípus pedig 30 %-os gyakoriságban volt kimutatható. A B haplotípus kizárólag a szárazságtűrés tekintetében toleránsnak ítélt genotípus csoportban fordult elő, mégpedig jelentősnek tekinthető, mintegy 36 %-os arányban.



40. ábra: A *HvDRF1* gén C-amplikon egyes haplotípusainak százalékan kifejezett előfordulási gyakorisága a tesztelt árpa törzskollekció toleráns és szenzitív genotípus csoportjában.

A haplotípus arányokban kimutatható lényeges eltérések hátterében meghúzódó genetikai faktorok közül részben a gén vizsgált szekvencia szakaszán detektált polimorfizmusok jelenlétéből következő tényezők is szerepet játszhatnak.

A 9. táblázat a *HvDRF1* gén C-amplikonjának haplotípusaiban EcoTILLING analízissal, és szekvenálással detektált polimorfizmusait tartalmazza. A fenotípusosan tesztelt genotípusok 4 unikális haplotípusában 9 SNP-t valamint 2 InDel-t azonosítottunk. A polimorfizmusok közül kódoló régióban helyezkedett el 8 SNP és egy 1 InDel. A tesztelt törzskollekcióban előforduló A, B és C haplotípusok polimorfizmus összetételét összehasonlítva 3 olyan aminosav cserét okozó, tehát a fenotípus szintjén is megnyilvánuló SNP polimorfizmus (9.S, 14S, 15S) is detektálható, amelyben a szárazságtoleranciában fontos

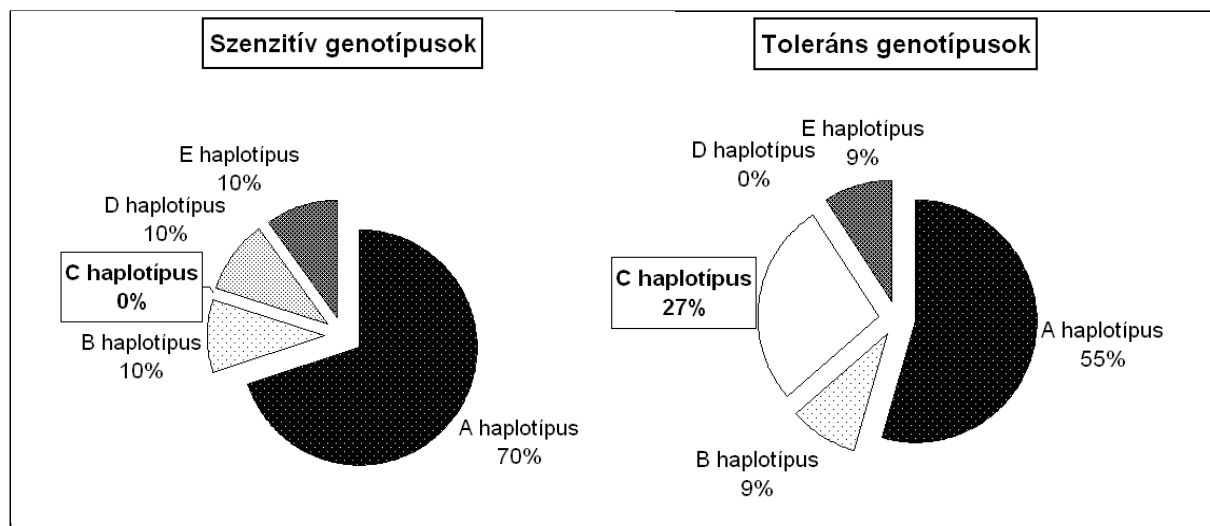
szerepet betöltő B haplotípus eltér mind az A mind pedig a C haplotípustól. A génről keletkező fehérje termékben a másik két előforduló variánssal összehasonlítva a B haplotípusban a 9. SNP jelenléte miatt glutamin helyett arginin; a 14. SNP következtében alanin helyett aszparaginsav; a 15. SNP polimorfizmus eredményeként pedig valin helyett izoleucin fordul elő. A polimorfizmusok biológiai szerepének valószínűségét tovább erősíti a 9. és a 14. SNP esetében történt kémiai karakterüket tekintve hidrofíl-bázikus illetve hidrofób-savas karakterű aminosav cserék. Ezek a polimorfizmusok akár jelentős változásokat is előidézhetnek a génről keletkező fehérjetermék térszerkezetében, illetve esetlegesen biológiai funkciójában is.

9. táblázat: A *HvDRFI* gén C-amplikonjában azonosított haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusokat és főbb jellemzőiket tartalmazó áttekintő táblázat.

	3.I	8.S	9.S	10.S	11.S	12.S	13.S	14.S	4.I	15.S	16.S
Szekvencia (adatbázis)	.	A	A	G	G	G	G	C	15bp	C	G
A haplotípus	.	A	A	G	G	T	A	C	15bp	.	G
B haplotípus	.	A	G	G	G	T	G	A	15bp	G	G
C haplotípus	.	A	A	G	G	T	G	C	.	C	G
D haplotípus	15bp	G	A	A	T	T	G	C	15bp	G	A
Nukleotid csere	./15 bp	A/G	A/G	G/A	G/T	G/T	G/A	C/A	CCCGAG CCAACA CTG/.	C/G/-	G/A
Exon/intron	I	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Aminosav csere	.	D/G	Q/R	V/V	A/S	R/L	M/I	A/D	ARANT/... -/AGANT	V/I	.

6.6.2.2. A *HvNHX1* gén haplotípus-termésstabilitás kapcsolata

HvNHX1 gén haplotípusainak előfordulási gyakoriságát tekintve szintén jelentősnek nevezhető eltérések figyelhetők meg (41. ábra) a termésstabilitásuk szerint különböző stressztűrési kategóriákba sorolt genotípusok között. A *HvNHX1* gén variánsai közül az A, a B és az E haplotípus jelenléte mindkét csoportban hasonló arányban mutatható ki. Azonban C haplotípus kizárólag a toleráns genotípusok körében van jelen, mégpedig jelentős, 27 %-os arányban, míg a D haplotípus pedig csak a szenzitív árpa vonalakban fordul elő 10 %-os gyakorisággal.



41. ábra: A *HvNHX1* gén egyes haplotípusainak százalékban kifejezett előfordulási gyakorisága a tesztelt árpa törzskollekció toleráns és szenzitív genotípus csoportjában.

A *HvNHX1* gén 5 unikális haplotípusát (A-E) megkülönböztető polimorfizmusokat a 10. táblázat tartalmazza. A 904 bp-nyi vizsgált szekvenciában 11 SNP-t detektáltunk, melyek közül 7 helyezkedett el kódoló régióban. Aminosav cserét okozó polimorfizmust nem detektáltunk a *HvNHX1* gén genomiális szekvenciájának általunk vizsgált szakaszán.

10. táblázat: A *HvNHX1* génben azonosított haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusokat és főbb jellemzőiket tartalmazó áttekintő táblázat.

	1.S	2.S	3.S	4.S	5.S	6.S	7.S	8.S	9.S	10.S	11.S
Szekvencia (adatbázis)	.	.	.	C	G	C	C	T	T	A	G
A haplotípus	G	T	A	C	G	C	C	T	T	A	G
B haplotípus	G	T	A	T	G	A	T	C	T	A	G
C haplotípus	G	T	A	C	G	C	C	C	T	A	T
D haplotípus	A	C	C	C	A	C	T	C	G	A	G
E haplotípus	G	T	A	C	G	C	C	C	T	G	G
Nukleotid csere	G/A	T/C	A/C	C/T	G/A	C/A	C/T	T/C	T/G	A/G	G/T
Exon/intron	I	I	I	E	E	E	E	E	E	E	I
Aminosav csere	.	.	.	P/P	A/A	L/L	I/I	R/R	P/P	S/S	.

6.6.3. A haplotípusok és a fenotípusos paraméterek asszociációs vizsgálata

Az esetlegesen fennálló további haplotípus–fenotípus kapcsolatok feltárása érdekében t-szeszten alapuló asszociációs vizsgálatot végeztünk az EcoTILLING módszerrel azonosított haplotípusok és az azokat hordozó árpa genotípusok meghatározott fenotípusos paraméterei

között. A t-teszt során a különböző fenotípusos és termésparaméterek vízmegvonás mellett mért, a kontroll körülményekhez viszonyított, százalékban kifejezett értékeit vettük alapul.

11. táblázat: A t-teszt során feltárt haplotípus-fenotípus asszociációk részletes paraméterei

Gén	Haplotípus/ tulajdonság	p- érték	Haplotípus hatás	Haplotípus átlaga	Haplotípus egyedszáma	Szórás	Többi haplotípus átlaga	Többi haplotípus egyedszáma	Szórás	Átlagok különbsége (%)	Szignifikancia mértéke
HvPPRPX	B haplotípus /harvest index	0,0054	Pozitív	127,96	4	26,4	89,91	17	20,9	38,05	***
HvPPRPX	B haplotípus /ezerszemsúly	0,0208	Pozitív	113,09	4	18,2	93,99	17	12,6	5,56	**
HvPI	B haplotípus /vízhasznosítási hatékonyság	0,0339	Pozitív	189,91	4	75,3	123,42	16	45,7	29,66	**
HvPPRPX	B haplotípus /vízhasznosítási hatékonyság	0,0452	Pozitív	185,18	4	74,8	123,37	17	46,4	5,56	**
HvPPRPX	B haplotípus /szemtermés	0,0504	Pozitív	62,24	4	23,2	44,23	17	13,6	19,10	*
HvDRF1C	B haplotípus /szemtermés	0,0713	Pozitív	59,41	5	10,6	43,98	16	16,9	15,43	
HvPI	B haplotípus /szemtermés	0,1055	Pozitív	60,25	4	21,8	44,63	16	15,1	15,63	

A szignifikancia mértéke: *** = nagyon szignifikáns ** = szignifikáns * = majdnem szignifikáns

A haplotípusok és a fenotípusos paraméterek t-teszten alapuló asszociációs vizsgálata során az árpa patogén gombák által indukált fehérjéjét kódoló gén (*HvPPRPX*) B-haplotípusa valamint a harvest index, az ezerszemsúly, a vízhasznosítási hatékonyság és a szemtermés között pozitív összefüggést tártunk fel (11. táblázat). Valamint a vakuoláris proton-inorganikus pirofoszfátáz fehérjét kódoló gén (*HvPI*) B-haplotípusa és a vízhasznosítási hatékonyság között volt kimutatható szignifikáns mértékű pozitív hatás.

A *HvPPRPX* gén EcoTILLING analízissel feltárt haplotípusait, és a bennük található polimorfizmusokat foglalja össze a 12. táblázat. A vizsgált genotípusok feltárt génszakaszában összesen 4 fő haplotípus volt elkülöníthető, melyekben összesen 1 InDel-t és 8 SNP-t detektáltunk, melyek közül 5 helyezkedett el kódoló régióban. Ezek közül pedig 2 okozott aminosavcserével járó mutációt a génről keletkező fehérjében.

A vizsgált gén - több fenotípusos paraméter pozitív irányú változásával is asszociációt mutató - B-haplotípusában található polimorfizmusok közül pedig összesen 3 db SNP

polimorfizmus mutat eltérést az összes további (A, C és D) haplotípustól, melyek közül a 2.S nevű SNP polimorfizmus aminosavcserét okozott. Ezen genetikai eltérések alapján fenn áll az elméleti lehetősége a génről keletkezett fehérje termék szerkezeti és/vagy funkcionális különbözőségének a további haplotípusokhoz viszonyítva.

12. táblázat: A *HvPPRPX* gén azonosított haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusokat és főbb jellemzőiket tartalmazó áttekintő táblázat.

	1.S	2.S	3.S	4.S	5.S	6.S	1.I	7.S	8.S
Szekvencia (adatbázis)	C	G	C	?	?	T	?	?	G
A haplotípus	C	G	A	T	T	C	..	A	G
B haplotípus	G	C	C	C	C	T	..	G	C
C haplotípus	C	G	A	T	T	T	TATA	G	G
D haplotípus	?	G	C	T	T	C	..	G	G
Nukleotid csere	C/G	G/C	C/A	T/C	T/C	T/C	-/TATA	-/G/A	G/C
Exon/intron	E	E	E	I	I	E	I	I	E
Aminosav csere	L/L	K/N	L/M	-	-	R/R	-	-	V/V

A *HvPI* gén szekvenciájának vizsgálata során 7 unikális haplotípus (A-E, U1, U3) volt elkülöníthető, melyek főbb jellemzőit a 13. táblázat tartalmazza. A vizsgált szekvenciában 18 SNP-t és 2 InDel-t detektáltunk, a polimorfizmusok közül 12 SNP helyezkedett el kódoló régióban, melyek közül a 7.S jelű SNP polimorfizmus aminosav cserével járó mutációt eredményezett. A génszakasz kódoló régiójában elhelyezkedő polimorfizmusokat áttekintve összesen 6 db kódoló régióban található SNP polimorfizmus (1.S, 3.S, 4.S, 6.S, 10.S, 12.S) esetében figyelhetők meg olyan nukleotid cserek, melyek a B-haplotípust a további detektált haplotípusok mindegyikétől megkülönböztetik.

13. táblázat: A *HvPI* gén azonosított haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusokat és főbb jellemzőiket tartalmazó áttekintő táblázat.

	1.S	2.S	3.S	4.S	5.S	6.S	1.I	7.S	8.S	9.S	10.S	11.S	12.S	13.S	14.S	2.I	15.S	16.S	17.S	18.S
Szekvencia (adatbázis)	?	?	C	C	C	-	-	G	A	G	T	?	G	?	?	?	?	?	?	A
A haplotípus	G	G	C	C	C	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	..	C	G	T	G
B haplotípus	T	G	T	T	C	T	T	G	A	G	C	C	A	T	A	..	C	C	C	A
C haplotípus	G	G	C	C	C	C	T	A	A	G	T	G	G	?	?	?	?	?	?	?
D haplotípus	G	G	C	C	T	C	T	G	A	G	T	G	G	C	G	..	T	G	T	A
E haplotípus	G	G	C	C	C	C	-	G	A	G	T	G	G	T	A	..	C	G	T	A
U1 haplotípus	G	C	C	C	C	C	T	G	A	T	T	G	G	C	A	GA	C	G	T	A
U3 haplotípus	G	G	C	C	C	C	T	G	G	G	T	G	G	C	A	..	C	G	T	A
Nukleotid csere	G/T	C/G	C/T	C/T	C/T	C/T	T/-	G/A	A/G	G/T	T/C	G/C	G/A	C/T	A/G	-/GA	C/T	G/C	T/C	A/G
Exon/intron	E	E	E	E	E	E	I	E	E	E	E	I	E	I	I	I	I	I	I	E
Aminosav csere	-	V/V	N/N	L/L	-	-	K/K	I/V	L/L	G/G	-	-	K/K	-	-	-	-	-	-	-

7. Az eredmények értékelése

7.1. Az EcoTILLING technológia alkalmazhatósága a szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltek vizsgálatában

A kvantitatív jellegű tulajdonságok, mint például a szárazságtűrés kialakításában szerepet játszó faktorok vizsgálata során a tulajdonság komplex jellege miatt számos gén és több különböző tolerancia szintű genotípus együttes bevonására van szükség.

Emellett a több genotípust tartalmazó populáció nagyobb genetikai diverzitás detektálását teszi lehetővé a kiválasztott génjelöltekben. A különböző génvariánsokat hordozó genotípusok nagy száma pedig emeli a szárazságtolerancia vonatkozásában értékes génvariánsok azonosításának valószínűségét is.

A genotípuskollekció vizsgált génszakaszainak többségében a statisztika tanulsága szerint (11. ábra) mindössze 3 haplotípus volt kimutatható jelentős arányban, a további haplotípusok döntő többsége inkább unikálisnak nevezhető. Ezt figyelembe véve az unikális haplotípusokat tartalmazó genotípusok által hordozott, potenciálisan értékes allélek megtalálásának valószínűsége jelentősen csak nagyszámú genotípus bevonásával lehetséges.

A közelmúltban kidolgozott EcoTILLING technológia (Comai és mtsai. 2004) a fenti célokra hatékonyan alkalmazható nagy áteresztőképességének köszönhetően. Az általunk használt EcoTILLING technológia előnye elsősorban abban keresendő, hogy a nagy vizsgálható mintaszám miatt nagyszámú polimorfizmus detektálható viszonylag kis fajlagos költséggel, hiszen nem szükséges valamennyi genotípus szekvenálását elvégezni, ugyanis elegendő, ha csupán haplotípus kategóriánként küldünk egyet-egyet szekvenálásra.

A HvDREB1-es gén esetében például a csupán 2 haplotípus kategória jelenlétéből adódóan 2 szekvenálás elvégzésével megismerhettük a jellegzetes haplotípusokat, amelyek nagy megbízhatósággal mind a 96 genotípus vizsgált génszakaszát jellemezhetik.

Abban az esetben, ha a vizsgált génről rendelkezésre áll pontos (genomiális DNS) szekvencia információ, átfedő amplitikonok segítségével feltárható a gén és teljes nukleotid környezete. Így többek között a promóter régióban esetlegesen megtalálható genetikai variabilitás, a cisz-elemek ismerete információval szolgálhat a transzkripció jellemzőivel kapcsolatban.

Kísérleteink során az általánosan alkalmazott fluoreszcens primer jelölés helyett fluoreszcens festékkel jelölt nukleotidokat építettünk a keletkező amplikonokba. A primereken alkalmazott különböző gerjesztési hullámhosszú festékkel történő jelölés ugyan lehetővé teszi a keletkezett fragmentumok megkülönböztetését, azonban tapasztalataink szerint jelentősen rontja a PCR reakció hatékonyságát. A beépítendő nukleotidokon végzett jelölés nem gátolja jelentős mértékben az amplifikáció hatékonyságát, növelve ez által a módszer eredményességét, illetve a nem elhanyagolható árkülönbségből adódóan a költséghatékonyságot is.

7.2. Az EcoTILLING módszerrel feltárt genetikai variabilitás összegző elemzése

Kutatásaink elsődleges célja egyrészt a szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek természetes variabilitásának vizsgálata volt az EcoTILLING módszerrel. Másrészt, ezzel párhuzamosan végeztük a fenotípusos tulajdonságok tesztjét egy Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer segítségével. Távlati céljaink között szerepelt a fenotípusos és a genotípusos adatok együttes kiértékelése a szárazságtűrés szempontjából funkcionális haplotípusok azonosítása céljából.

Az EcoTILLING vizsgálatokhoz szárazságtűrés szempontjából nagy genetikai variabilitást mutató, 96 genotípust tartalmazó árpa kollekciót állítottunk össze, amelyben a szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek génvariánsainak/haplotípusainak elkülönítését végeztük az EcoTILLING módszerrel. Árpa szárazságtűréssel foglalkozó irodalmi adatok alapján vizsgálatainkhoz 9 gént választottunk ki.

Vizsgálataink eredményeként az EcoTILLING módszer hatékonyságának köszönhetően mintegy 1,5 millió bázispárnyi szekvencia vált ismertté, a vizsgált 9 gén 18 amplikonjában összesen 94 haplotípust (allélvariáns) különítettünk el, 185 SNP-t és 46 InDel-t azonosítottunk. A polimorfizmusok közül összesen 53 SNP és 5 InDel helyezkedett el kódoló régióban és összesen 22 okozott aminosav cserével járó mutációt a génről keletkező fehérjében.

Az EcoTILLING technológia alkalmazásával tehát nagyszámú polimorfizmus detektálható viszonylag alacsony fajlagos költséggel, hiszen nem szükséges valamennyi genotípus szekvenálását elvégezni, ugyanis elegendő, ha csupán haplotípus kategóriánként küldünk egyet-egyet szekvenálásra. Az EcoTILLING módszer tehát kiválóan alkalmas a

természetes populációkban előforduló polimorfizmusok gyors és költséghatékony kimutatására (Simsek és Kacar 2010).

Az általunk használt EcoTILLING technológia előnye tehát elsősorban abban keresendő, hogy az elvégzendő szekvenálások száma jelentősen mértékben leredukálható, így a természetes populáció tagjaiban megtalálható polimorfizmusok detektálásához szükséges fajlagos idő és eszköz ráfordítás nagymértékben lecsökkenthető, tehát új távlatok nyílhatnak az egyszerre vizsgált genotípusok számát illetően is.

A polimorfizmusok előfordulási gyakorisága a vizsgált génszakaszok mentén az SNP polimorfizmusok esetében 92,4 bp/SNP, az InDel-ek esetében pedig 371,7 bp/InDel volt. Az árpa gének variabilitását feltáró polimorfizmus gyakorisági értékek meglehetősen tág határok között változnak. Az árpa *Isa* génjében a feltárt polimorfizmusok átlagos gyakorisága 1 SNP/27 bp és 1 InDel/94 bp (Bundock és Henry 2004) volt; számos, részben ismeretlen funkciójú genomiális régió átlagát tekintve a polimorfizmus gyakoriság 1 SNP/78 bp, 1 InDel/680 bp szinten alakult (Russell és mtsai. 2004). Az abiotikus stresszválaszban szereplő gének SNP összetételét vizsgálva Rostoks és mtsai. (2005) 200 bp-os átlagos polimorfizmus gyakoriságot találtak. Összességében elmondható, hogy eredményeink a szakirodalomban fellelhető tág határok között mozgó polimorfizmus gyakorisági értékek közé illenek.

7.3. A kifejlesztett markerkombinációk hasznosíthatósága

Az általuk legfontosabbnak ítélt, illetve genomiális DNS szekvencia birtokában átfedő amplikonok segítségével teljes hosszukban vizsgált gének esetében haplotípus specifikus markerkészletet hoztunk létre. Ezek a molekuláris eszközök a hagyományos árpanemesítés során a szelekcióban is felhasználhatók. Tesztelésük érdekében elvégeztük a teljes, 96 tagot számláló genotípus kollekció ismételt genotipizálását is.

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

A haplotípus-szekvenciák és polimorfizmusok birtokában olyan markerkombinációkat 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 *HvARH1* gén teljes szekvenciáiban összesen 77 polimorfizmust (56 SNP-t és 21 InDel-t) azonosítottunk. Hét polimorfizmusra tervezett markerek segítségével mind a 9 haplotípus elkülöníthetővé vált. A *HvSRG6* 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.

Malatrasi és mtsai. (2002) a *HvSRG6*-os gén emelkedett expresszióját mutatta ki szárazság stressz illetve abszcizinsav kezelés hatására, mely eredmények arra engednek következtetni, hogy a gén komoly szereppel bírhat a szárazságtűrés kialakításában. Kísérleteink során a *HvSRG6*-os gén promoter régiójában egy 196 bp hosszúságú InDel-t detektáltunk, amely esetlegesen fontos befolyással bírhat a génkifejeződés szempontjából.

A kifejlesztett markerekkel a teljes árpa populáció ismételt genotipizálását elvégeztük. Az EcoTILLING vizsgálattal meghatározott haplotípus szekvenciák ismeretében kifejlesztett könnyen detektálható genetikai markerek közvetlenül felhasználhatók az árpa szárazságtűrés feltárására irányuló vizsgálatok, (Pl. QTL térképezés) illetve az árpa szárazságtűrésre történő nemesítése során a markerekre alapozott szelekcióban.

7.4. A stressz paraméterek alakulásából levonható következtetések

A szárazságtolerancia mértékének tesztelése érdekében összeállítottunk egy 23 genotípusból álló árpa törzskollekciót, mely részét képezi az EcoTILLING analízishez használt tágabb genotípus kollekciónak. A kiválasztott 23 árpa vonal széleskörű fenotípusos jellemzését üvegházi körülmények között, Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával, genotípusonként 5-5 kontroll, illetve stressztelt növényvel végeztük el. A vizsgált genotípusok számának leszűkítését a kapacitás és anyagi lehetőségek korlátozottsága tették szükségessé. Ugyanakkor ezek a kísérletek nélkülözhetetlenek voltak a rendszer működésének teszteléséhez.

A hagyományos, vizuálisan és mérésekkel meghatározható fenotípusos tulajdonságok 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, melyek kiértékelése útján meghatározható a vízmegvonás hatására bekövetkező légcsere aktivitás vesztes a genotípusok esetében. Munns és mtsai (2010) szerint a nagy kapacitású fenotipizálási rendszerek esetében a tömeg meghatározáson alapuló öntözési rendszerek, illetve a digitális technológiát alkalmazó biomassa becslési technológiák kulcs szereppel bírnak.

Az árpa törzskollekcióban sikerült azonosítanunk olyan, magas fokú rezisztenciával rendelkező genotípusokat, amelyek további, a szárazságtűrés genetikai hátterének feltárását célzó vizsgálatok alanyaiként szolgálhatnak. Ezen kívül a kiválasztott szárazságtűrő genotípusok keresztezési partnerként bevonhatók új, fokozott szárazságtűréssel rendelkező árpafajták előállítását célzó nemesítési programokba is.

A *Triticeae* tribusz fajainak kromoszómái között meglévő homeológia miatt (Feuillet és Keller 2002) az általunk feltárt eredmények a tribuszba tartozó további fajokra is részben érvényesek és felhasználhatók lehetnek.

A kiválasztott szárazságtűrő genotípusokat Dr. Palágyi András árpanemesítő közreműködésével keresztezési partnerként felhasználtuk egy nemesítési programban, mely a magas termőképesség mellett fokozott szárazságtűréssel is rendelkező árpafajták előállítását célozza. Eddigi vizsgálataink alapján valószínűsíthető, hogy a tesztelt árpa vonalak között több ígéretes, a későbbiekben fajtajelöltnek is alkalmas genotípus van.

7.5. A fontosabb fiziológiai és agronómiai paraméterek közötti kapcsolat, a termőképesség javításának lehetőségei

A fokozott szárazságtűréssel rendelkező fajták előállítása során a szárazságtolerancia rendkívül komplex voltából adódóan számos, a stressztűrőképességgel, illetve a termőképességgel összefüggésbe hozható agronómiai paraméter egyidejű és megfelelően súlyozott arányú figyelembevételére van szükség. A nemesítési tevékenységet nagyban elősegítheti, ha pontos adatok állnak rendelkezésre a tekintetben, hogy melyek a legfontosabb figyelembeveendő paraméterek. Az eredmények statisztikai kiértékelése nyomán fény derült

bizonyos adatsorok nagymértékű hasonlóságára, melyek fontos támpontként szolgálhatnak az egyes tulajdonságok fontosságának megítélésében.

A stresszkezelés alatt mért és a kontroll értékhez viszonyított adatok alapján felállított genotípus rangsorok több esetben is lényeges megegyezést mutattak. A legfontosabb agronómiai tulajdonsággal, a termőképességgel a legmagasabb korrelációt mutató két paraméter a harvest index ($R^2=0,75$) és a vízhasznosító képesség ($R^2=0,66$) volt.

A vízfelhasználási hatékonyság rendkívül fontos paraméter, hiszen amennyiben egy termőhely vízellátását - a csapadékellátottságtól, mint jelenleg nem vagy alig befolyásolható adottságtól függően, illetve öntözés hiányában - adottnak tekintjük, kizárólag a vízfelhasználási hatékonyság növelése útján érhető el további hozamnövekedés (Condon és mtsai. 2004; Chaves és mtsai. 2010). Skirycz és mtsai (2011) szerint a szárazság stresszel szembeni toleranciát vizsgáló kísérletek esetében az öntözési protokollnak, azaz a kijuttatott víz mennyiségének és időbeni eloszlásának nagy jelentősége van. Kísérleteink során 60- és 20 %-os talaj víztartalom mellett teszteltük az árpa genotípusok szárazságtűrését. Az alkalmazott vízmegvonás hatására a vízhiányos növények a kontroll növényekhez képest jelentős növekedésbeni depressziót illetve termés kiesést mutattak (22. és 28. ábra).

Abban az esetben, ha a termelés elsődleges célja csupán valamely növényi rész minél nagyobb mennyiségben történő előállítás, akkor az egyes növényi szervek arányának megváltoztatása is lehet nemesítési cél. A gazdasági jelentőséggel bíró, és ilyen módon a preferált növényi szerv az árpa és általában a termesztett gabonafélék esetében a szemtermés.

A szemtömeg és a föld feletti részek tömeg arányának kifejezésére elterjedten használt mérőszám pedig a harvest index, amely paraméter figyelembe vétele nagy fontossággal bír a gabonafélék szárazságtűrő képességének fokozásában (Khakwani és mtsai. 2011). Ezen egyszerűnek tűnő termésparaméterek kiszámítása illetve egy növényre történő levetítése azonban szántóföldi, illetve kevésbé szabályozott üvegházi körülmények között számos nehézségbe ütközik. A Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használata útján a harvest index kiszámításának alapjául szolgáló mindkét tényezőről rendkívül pontos adatokat kaphatunk. Hiszen a rendszer használatával egy genotípust több ismételten, egyedi növényenként, illetve térfogatra azonos tenyésztésterületen kontrollált vízellátás mellett vizsgálunk.

Mivel vízhasznosítási hatékonyság meghatározásának korábban már taglalt okokból szintén kiváló eszköze a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer, így kijelenthető hogy az agronómiai szempontból elengedhetetlenül fontos, de természetes körülmények között

nehezen vizsgálható paraméterek meghatározásában a rendszer bevezetésének köszönhetően új távlatok nyílhatnak.

Ezek az egybevágó eredmények egyrészt egymást megerősítve növelik a fenotipizálási adatok hitelességét, másrészt a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer alkalmazhatóságának bizonyítékául szolgálhatnak.

7.6. Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatából fakadó előnyök

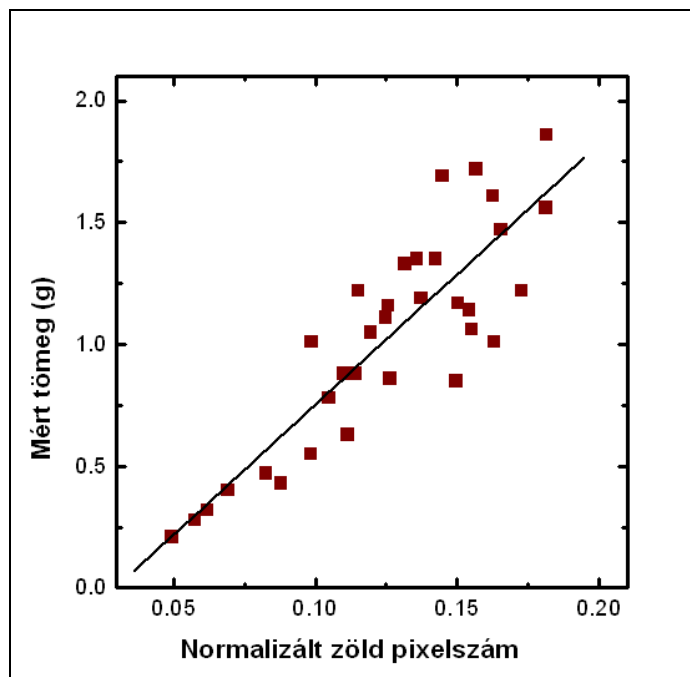
A képkalkulációs technológiákra alapozott fenomika, mint új diszciplína bontakozik ki az élettudományok területén (Houle és mtsai. 2011). A genomikai módszerek tökéletesedével egyidőben fokozódik az igény a fenotípusos tulajdonságok mennyiségi jellemzőinek nagy pontosságú ismerete iránt. A növények sem jelentenek kivételt ezen csúcstechnológiai fejlesztések sorában. A nemzetközi tapasztalatok azt mutatják, hogy igen magas költséggel alakítják ki azokat a fenotipizálási kapacitásokat, amelyek nagyszámú növény vizsgálatát teszik lehetővé. A fenotipizálási koncepció alap eleme, hogy nagy áteresztőképességet, automatizálást feltételez. A Szegeden kialakított Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer az anyagi források hiányában csak korlátozottan tud megfelelni a nemzetközi elvárásoknak. Az öreg üvegházakban felépített, csak részben automatizált rendszer elsődlegesen, mint első hazai kezdeményezés a növény fenotipizálás elindítását tekintette céljának. A jelen kísérletekben a kis genotípus szám kompromisszumot követel az eredmények általánosításakor.

Ugyanakkor a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer alkalmazása számos további előnnyel jár a szárazságtolerancia tesztelése során. A rendszer fontos tulajdonsága, hogy pontosan szabályozott körülményeket biztosít a fejlődő növények számára, így a kívánt stresszkörülmények könnyen és gyorsan előállíthatók, illetve a kísérletek könnyen reprodukálhatók.

A növények fejlődése folyamatosan nyomon követhető, illetve számos stressz paraméter folyamatosan meghatározható, mégpedig a növény károsítását kiküszöbölő, nem invazív módon.

A biomassa felhalmozódás időbeni lezajlása az egyik legfontosabb, a növény stressz állapotára utaló paraméter (Golzarian és mtsai. 2011, Hartmann és mtsai. 2011). Ezen tulajdonság nem invazív, pixel analízis útján történő tanulmányozása kulcs eleme lehet a

hasonló kutatásoknak. Jelenlegi adataink a pixel alapú zöldfelület nagyságát mutatják. Joggal merül fel az elvárás, hogy ezek alapján kerüljön megállapításra a növények zöldbiomassza tömege. Ennek érdekében kalibrációs görbék felvételére van szükség. Ez meg is történt az általunk használt rendszer esetében, búza növények felhasználásával. Vass Imre és Sass László adatai szerint (42. ábra, közöletlen eredmény) a mért növény súly és a zöld pixel jól illeszthetők egymáshoz. Ezek a mérések megerősítik a pixel alapú zöldfelület becslések használhatóságát a stresszválasz jellemzésére.



42. ábra: A pixel alapú zöldfelület és a mért biomassza tömeg közötti kalibrációs görbe.

A kontroll valamint stresszelt körülmények között tartott genotípusok transzspirációs aktivitásának levélhőmérséklet alapján történő meghatározása során szignifikáns, átlagosan mintegy 0,41 °C-os levélhőmérséklet eltérést detektáltunk. Továbbá jelentős eltéréseket tapasztaltunk a különböző stressz tolerancia szinteket képviselő genotípusok között is vízmegvonásos körülmények között.

Az egyes genotípusok vízellátottságának valamint stressz toleranciájának meghatározásában fontos szerep juthat a vizuális felvételek készítésére és felületi levélhőmérséklet meghatározására együttesen képes rendszereknek (Möller és mtsai. 2007).

Blum és mtsai. (2009) szerint vízfelhasználás és a transzspirációs aktivitás együttes figyelembevételével nyerhetünk pontos információt a gabonafélék vízhasznosításáról. Az általunk alkalmazott fenotipizálási rendszer megteremti mindkét paraméter meghatározásának lehetőségét.

Mivel a szárazságtolerancia kiterjedt genetikai hátterével összefüggésben a fenotípusos megjelenése is igen sokrétű ezért a mért adatok és meghatározott paraméterek lehető legszélesebb körű figyelembe vételével kaphatunk megfelelő képet a vizsgált növények stressz toleranciájának mértékéről.

Ezen kívül a rendszer használatával egyidejűleg jellemezhetjük az optimális és a stressz körülmények között élő növények élettani paramétereit, így nagy biztonsággal választhatók ki az agronómiai szempontból ideálisnak tekinthető genotípusok, melyek kedvező körülmények között kihasználva magas terméspotenciáljukat versenyképes mennyiségű termést adnak, vízhiány esetén pedig képesek - minden esetben optimális szinten működtetve az anyagcseréjüket - kielégítő termést adni.

A szárazság tolerancia megnyilvánulásának komplexitása miatt kiemelt szerep tulajdonítható a nagy áteresztő képességű, automatizált fenotipizálási rendszerek kifejlesztésének (Munns és mtsai. 2010; Berger és mtsai. 2010). Az ilyen rendszerek esetében fontos, hogy a növények vízellátásának pontos szabályozása (Skirycz és mtsai. 2011) mellett mód nyíljon számos, a szárazságtűréssel összefüggő, fent említett fenotípusos fiziológiai és agronómiai paraméter meghatározására.

7.7. A haplotípus-fenotípus kapcsolatok kutatásának jelentősége

Távlati céljaink között szerepelt a genotípusos és fenotípusos tulajdonságok összefüggéseinek keresése a szárazság tolerancia kialakításában szerepet játszó funkcionális génvariánsok azonosítása céljából. Ezért kutatásaink során megkíséreltünk potenciális kapcsolatot kimutatni a vizsgálatba vont genotípusok szárazságtoleranciája és a vizsgált, szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó gének elkülönített haplotípusai között.

A fenotípusos és genotípusos adatok együttes kiértékelése során talált összefüggések megerősítik a genomikai és fenomikai módszerek együttes alkalmazásának szükségességét és fontosságát. A szárazságtűrés szempontjából funkcionális allélek szerepének igazolásához azonban nagyobb (lehetőleg 100 db feletti genotípus) populáción végzett asszociációs vizsgálatra van szükség. Erre a jelen vizsgálatainkban nem volt lehetőség, ezért csak a jellemzők kapcsolatáról tudunk információt adni.

Amennyiben az azonosított génjelöltek haplotípusai és a szárazságtűrésben tesztelt fenotípusuk között asszociációs kapcsolat meglétét akarjuk a jövőben igazolni, további

kísérletekre van szükség nagyobb genotípus minta bevonásával. A kifejlesztett markereket diagnosztikai eszközként lehet alkalmazni a nemesítés során. Ezek a potenciálisan „génen belüli” markerek közvetlenül felhasználhatók az árpa szárazságtűrés QTL térképezése során, valamint a markerre alapozott szelekcióban.

Befejező konklúzióként levonható, hogy akárcsak az élettudományok számos más területén, a szárazságtűrésre irányuló kutatásokban is a csúcstechnológiák használata révén a nagyfokú komplexitás elemei és azok összefüggései feltárhatók. A szárazságtolerancia természetéről szerzett ismeretek az interdiszciplináris megközelítések eredményeinek köszönhetően mind megbízhatóbban segíthetik a fajtaelőállító nemesítést és ezzel hozzájárulhatnak a fenntartható fejlődés feltételeinek megteremtéséhez.

8. Összefoglalás

Jelenleg világszerte és hazánkban is a szárazságstressz az egyik legjelentősebb termés korlátozó tényező a gabonafélék, így az árpa esetében is. Következésképpen a legfőbb nemesítési célok közé tartozik új, fokozottabb szárazságtoleranciával rendelkező fajták előállítása. A nemesítés sikeressége nagymértékben függ attól, hogy sikerül-e megértenünk a komplex és kvantitatív jellegű tulajdonság kialakításában részt vevő genetikai faktorokat.

A komplex tulajdonságok, mint például a szárazsághoz történő alkalmazkodás fejlesztését elősegítheti a genomikai és fenomikai megközelítések kombinációja. A meglévő természetes genetikai variabilitás meghatározása pedig értékes információval szolgálhat a szárazságtűrésben résztvevő gének funkcióját illetően. A genotípus-fenotípus asszociációk együttes vizsgálata lehetővé teheti a vizsgált génjelöltek szárazságtoleranciában betöltött funkciójának megerősítését.

Az árpa szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó génjelöltek genomikai adatait a polimorfizmusok hatékony feltárására alkalmas EcoTILLING technológia használata útján nyertük. A fenomikai adatsorokat üvegházi körülmények között, Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer alkalmazásával állítottuk elő.

Az EcoTILLING módszer egy nagy kapacitású, viszonylag alacsony költséggel kivitelezhető eljárás, mely lehetővé teszi a természetes populációkban megtalálható polimorfizmusok hatékony detektálását. A módszer a TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) technológia egyik változata, amely bizonyos PCR lépéseken alapszik, úgymint heteroduplex képzés, valamint a kialakult mismatch pozíciók nukleáz enzimekkel történő emésztése. A technológia alkalmazása útján egyaránt lehetővé válik a polimorfizmusok feltárása, illetve a haplotípusok elkülönítése az azonosított egyedi haplotípusok szekvenálása útján. Kutatásaink céljai között szerepelt az árpa szárazságtűrésének hátterében álló genetikai faktorok vizsgálata a fenomikai és genomikai megközelítések egyesítésének útján.

Az EcoTILLING reakció magában foglalta a vizsgált génszakasz fluoreszcens nukleotidok jelenlétében végzett PCR-amplifikációját. A kapott amplikonokat a heteroduplex képzés után az egyszálú DNS-re specifikus aktivitással rendelkező Cel1-es endonukleázzal emésztettük a „mismatch” pozíciókban, majd ABI 377-es szekvenáló készüléken különítettük el a fragmentumokat molekulaméretük szerint. Végül az azonosított haplotípusokat forward és reverz irányból is megszekvenáltuk.

Vizsgálatainkhoz a világ számos pontjáról gyűjtött 96 genotípust /termesztett fajtákat, ökotípusokat és vad változatokat/ is tartalmazó, szárazságtűrés szempontjából variábilis árpa kollekciót állítottunk össze. A génjelöltek kiválasztása során a szárazságtűréssel foglalkozó szakirodalmi adatokra (gén expressziós, illetve QTL térképezési vizsgálatok, transzgenikus kutatások) támaszkodtunk.

Elsődleges célunk volt az árpa szárazság tűrésében potenciálisan szerepet játszó génjelöltek természetes genetikai variabilitásának feltárása az EcoTILLING technológia, mint a polimorfizmusok azonosítására alkalmas eszköz alkalmazása útján. További céljaink között szerepelt könnyen detektálható genetikai markerek (potenciálisan „génen belüli markerek”) kifejlesztése az átfedő haplotípus szekvenciák birtokában, amelyek lehetővé teszik a főbb, elsősorban aminosav szinten különbséget mutató haplotípusok elkülönítését.

Az alkalmazott technológia segítségével mintegy 1,5 millió bázispárnyi szekvencia vizsgálata nyomán 94 egyedi allélvariánst különítettünk el a 9 génre tervezett 18 amplikon elemzése útján. Egy bázispárnyi eltérést (SNP) 185, inszerció/delécio-t (InDel) pedig 46 esetben azonosítottunk, a polimorfizmusok átlagos gyakorisága 1 SNP/92 bp illetve 1 InDel/372 bp volt. Az amplikonok vizsgálata során az azonosított haplotípusok száma 2 és 9 közé esett.

Összesen 4 gén – *Hordeum vulgare* L. AR-h gene for aldose reductase (*HvARH1*), *Hordeum vulgare* L. *HVA1* gene (*HvA1*), *Hordeum vulgare* L. *HvSRG6* gene for stress responsive gene protein 6 (*HvSRG6*), *Hordeum vulgare* L. AP2 transcriptional activator gene (*HvDRF1*) - esetében olyan informatív polimorfizmusokat konvertáltunk át genetikai markerekké, melyek által elkülöníthetők a valószínűsíthetően funkcionális allélvariánsok. Továbbá ezek a könnyen detektálható genetikai markerek hasznosíthatók kapcsoltsági térképezések során illetve a markerekre alapozott szelekcióban.

Kutatásaink további fontos eleme volt egy árpa genotípus törzskollekció szárazságra adott válaszreakcióinak jellemzése a morfológiai, fiziológiai és agronómiai paraméterek monitorozása útján kontroll és stresszelt körülmények között Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával. Célul tűztük ki továbbá a tesztelt genotípusok fenotipikus stressz paraméterek és a szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltek azonosított haplotípusainak összetétele közötti kapcsolatok feltárását. Célunk volt ezen túlmenően egy, az árpa szárazságtűrésének jellemzésére használható alapvető metodika kialakítása a fenotípusos és haplotípusos eredmények együttes kiértékelése útján.

A szárazságtolerancia mértékének és további fontos agronómiai tulajdonságok Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszerben történő tesztelése érdekében összeállítottunk egy

23 genotípust tartalmazó árpa törzskollekciót. A morfológiai és fiziológiai tulajdonságok monitorozását kontroll (60 %-os vízellátottság a teljes tenyészidő alatt) és stressz (20 %) körülmények között különböző képközelítő eljárások alkalmazásával végeztük.

A morfológiai, fiziológiai tulajdonságok, illetve a szárazságtűréssel összefüggésbe hozható agronómiai paraméterek vizsgálatát többek között digitális fényképezés, illetve hőkamerás levélhőmérséklet meghatározás alkalmazásával egy fél-automata fenotipizálásra alkalmas eszköz, a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával végeztük el.

Vizsgálataink során jelentős mértékű korrelációt találtunk a vizsgált genotípusok termés mennyisége illetve további fontos agronómiai paraméterei között, mint például a harvest index, a vízhasznosító képesség és az ezerszemsúly. Ezen eredmények a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatából fakadó előnyökre hívhatják fel a figyelmet.

A hőkamerás mérések alkalmával a szárazság stressznek kitett növények esetében magasabb levélhőmérsékleti értékeket detektáltunk. A kiválasztott genotípusok esetében a mért levélhőmérséklet és a pixel alapú zöldfelület között kapcsolatot lehetett kimutatni.

A meghatározott pixel alapú zöldfelület alapján a genotípusokat stressz reakciójuk szerint toleráns és szenzitív kategóriákba soroltuk az csökkenés 45 %-os értékét elkülönítő szintként választva.

Az analízis során a toleráns és a szenzitív kategóriákba tartozó genotípusok haplotípus összetételében jelentős különbségeket találtunk a *HvAI* gén esetében. A genotípusokat termésstabilitásuk szerinti rangsor alapján szintén toleráns és a szenzitív kategóriákba soroltuk a terméskiesés 55 %-os értékét küszöbszintként véve alapul. A toleráns, illetve szenzitív genotípusok haplotípus összetételét összehasonlítva a *HvDRF1* és a *HvNHX1* gén esetében lényeges eltéréseket találtunk. A haplotípusok és a fenotípusos paraméterek t-teszten alapuló asszociációs vizsgálata során az árpa patogén gombák által indukált fehérjéjét kódoló gén (*HvPPRPX*) B-haplotípusa valamint a harvest index, az ezerszemsúly, a vízhasznosítási hatékonyság és a szemtermés között pozitív összefüggést tártunk fel.

A kísérleteink eredményeként rendelkezésre álló fenotípus és haplotípus információkat tartalmazó adatsorok fontos kiindulási pontjai lehetnek a szárazságtűrésben fontos szereppel rendelkező génvariánsok QTL illetve asszociációs vizsgálatokkal történő azonosítása során.

9. Summary

In the World and in Hungary the drought stress is a main factor limiting the yield of cereals including barley. Accordingly the development of new barley varieties with improved drought tolerance is one of the central breeding objectives. The probability of a successful breeding for drought tolerance is largely dependent on the understanding and knowing of the genetical factors that regulate this complex and highly quantitative trait.

Genetic improvement of complex traits such as drought adaptation can be advanced by combination of genomic and phenomic approaches. The determination of natural genetic variation in candidate genes can provide valuable information about gene function. Using genotype-phenotype data can help the validation of the involvement of candidate genes in the drought tolerance.

Genomic data were obtained from barley drought-related candidate genes using EcoTILLING technology as a polymorphism discovery tool. Phenomic data were generated in the greenhouse by the complex stress diagnostic system.

EcoTILLING is a high throughput, low cost technique for rapid discovery of polymorphisms in natural populations. It is a variant of TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) that is based on certain PCR steps, such as the formation of heteroduplexes and a nuclease cutting of the DNA mismatches. It allows both polymorphism discovery and haplotyping through the sequencing of unique haplotypes. We aimed to understand the genetic background of the drought tolerance of barley via the combination of phenomic and genomic data.

The EcoTILLING reaction included a PCR amplification of targets with fluorescently labeled nucleotides. After heteroduplex formation amplicons were digested in „mismatch” positions by CEL1 single-strand specific endonuclease and screened on ABI PRISM 377 sequencer. Unique haplotypes were sequenced for each gene in both forward and reverse direction.

We have established a set of 96 barley genotypes, which contains drought tolerant and sensitive genotypes /cultivars, ecotypes and wild relatives/ collected worldwide. Candidate genes were selected on the basis of studies dealing with drought tolerance (gene expression and QTL mapping studies, transgenic approaches).

In the one hand our main goal was the analysis of natural variation of drought-related candidate genes in barley using the EcoTILLING technology as a polymorphism discovery tool. We aimed to develop easily detectable genetic markers (potential „within gene marker”) based on overlapping haplotype sequences, which allows distinguishing the main haplotypes showing differences in amino acid sequence.

By using this method approximately 1.5 million basepairs in barley a total number of 94 verified unique haplotypes were identified in 18 amplicons designed for 9 genes. Overall, 185 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 46 insertions/deletions (InDels) were detected with a mean of 1 SNP/92 bp and 1 InDel/372 bp genomic sequence. The number of haplotypes identified for screened amplicons ranged from 2 to 9.

Based on overlapping haplotype sequences of four candidate genes – *Hordeum vulgare* L. AR-h gene for aldose reductase (*HvARH1*), *Hordeum vulgare* L. *HVA1* gene (*HvA1*), *Hordeum vulgare* L. *HvSRG6* gene for stress responsive gene protein 6 (*HvSRG6*), *Hordeum vulgare* L. AP2 transcriptional activator gene (*HvDRF1*) - informative polymorphisms were converted into genetic markers allowing the detection of the potential functional haplotypes. In addition these easily detectable genetic markers are useful for linkage mapping and Marker Assisted Selection.

In the other hand our main goal was the characterization of drought responses of barley genotypes by monitoring a set of morphological and physiological and agronomical traits under control and stress conditions using the complex stress diagnostic system in greenhouse. We aimed to find potential links between phenotypic stress parameters and identified haplotype composition in the drought-related candidate genes of the tested genotypes. We have established a basic methodology for combination of phenotyping and haplotyping data in characterization of drought responses of barley.

To test drought tolerance and agronomic parameters using a complex stress diagnostic system we have established a subcollection of 23 barley genotypes. Morphological and physiological traits was monitored under optimal (60 % water supply for the whole life cycle) and stress (20 %) conditions. A semi-robotic work station was used for computer controlled watering and digital or thermal imaging. By using imaging technologies such as digital photography and thermal imaging we monitored the pixel-based green surface, growth rate and transpirational activity of barley genotypes.

Morphological, physiological and drought tolerance-related agronomic parameters were monitored by digital photography and thermal imaging using a semi-automated phenotyping platform called complex stress diagnostic system.

We found significant correlations between grain yield of the genotypes and other important agronomic parameters such as harvest index, water use efficiency and thousand grain weight. Thermal images showed warmer canopy temperature of drought-exposed plants, in selected cases the actual leaf temperature could be related to pixel-based green surface.

Based on pixel-based green surface, the tested genotypes can be grouped by selection of 45% yield loss as discriminative value between tolerant and sensitive stress responses. Analysis of *HvA1* gene revealed significant differences in haplotype distribution between tolerant and sensitive genotypes.

Based on grain yield stability, the genotypes were grouped by selection of 55% grain yield loss as discriminative value between tolerant and sensitive drought stress responses. Comparison of the haplotype composition of genotypes from the tolerant and sensitive groups indicates an essential difference in case of *HvDRF1* and *HvNHX1* genes. The haplotype/trait association analysis based on the t-test has revealed a positive effect of the haplotype B of the gene encoding the barley fungal pathogen induced mRNA for pathogen-related protein (*HvPPRPX*) on harvest index, thousand grain weight, water use efficiency and grain yield.

The phenotypic and haplotype dataset created in the frame of this study provides a good starting point to design large scale QTL or association studies aiming to validate the interesting candidate gene variants.

10. Irodalomjegyzék

- Aghnoum R, Marcel TC, Johrde A, Pecchioni N, Schweizer P, Niks RE (2010) Basal Host Resistance of Barley to Powdery Mildew: Connecting Quantitative Trait Loci and Candidate Genes. *Molecular plant-microbe interactions* Volume 23, Number 1, Pages 91-102
- Altinkut A, Kemal K, Ipekci Z, Gozukirmizi N (2001) Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F2 populations of barley and heat. *Euphytica* 121: 81-86
- Apel K, Hirt H (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399
- Bahieldin A, Mahfouz HT, Eissa HF, Saleh OM, Ramadan AM, Ahmed IA, Dyer WE, El-Itriby HA, Madkour MA (2005) Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* 123:421-427
- Barnabás B, Jager K, Fehér A (2008) The effect of drought and heatstress on reproductive processes in cereals *Plant, Cell and Environment* 31, 11–38
- Bartels D, Engelhardt K, Roncarati R, Schneider K, Rotter M, and Salamini F (1991) An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO J.* 10(5):1037–1043.
- Bartels D (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Sci.* 6:284–286
- Bencze Sz, Bamberger Zs, Janda T, Balla K, Bedő Z, Veisz O (2011) Drought tolerance in cereals in terms of water retention, photosynthesis and antioxidant enzyme activities *Central European Journal of Biology* 6 (3), 376-387
- Berger B, Parent B, Tester M (2010) High-throughput shoot imaging to study drought responses. *Journal of Experimental Botany* 61, 3519–3528

- Blum A (2009) Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, Volume 112, Issues 2–3, Pages 119–123
- Bräutigam A, Gowik U (2010) What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biology*, Volume 12, Issue 6, pages 831–841
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K. (2007) Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNHX1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* 58:301–308
- Bundock PC, Henry RJ (2004) Single nucleotide polymorphism, haplotype diversity and recombination in the *Isa* gene of barley. *Theor. Appl. Genet.* 109:543–551
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck F, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Francia E, Marè C, Tondelli A, Stanca AM (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field crops research* Volume 105, Issues 1–2, Pages 1–14
- Ceccarelli S, Grando S (1999) Barley landraces from the Fertile Crescent: a lesson for plant breeders. In: Brush S.B. (ed.): *Genes in the field*. IPGRI, IDRC, Lewis Publ., Ottawa, Canada: 51–76
- Chaves M M, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551–560, 2009
- Chaves M and Davies B (2010) Drought effects and water use efficiency: improving crop production in dry environments. *Functional Plant Biology*, 37, iii–vi
- Chen THH, Murata N (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 250–257

- Choi DW, Zhu B, Close TJ. (1999) The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1234–1247
- Close TJ (1997) Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100:291–296
- Colbert, T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001) High-throughput screening for induced point mutations. *Plant physiology* 26:480-484
- Comai L, Young K, Reynolds SH, Codomo C, Enns L, Johnson J, Burtner C, Henikoff JG, Greene EA, Till BJ, Henikoff S (2004) Efficient discovery of nucleotide polymorphisms in populations by ecotilling. *Plant J* 37:778-786
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD (2004) Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55, 2447–2460
- Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Feller U (2008) Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties *Plant Growth Regulation* Volume 56, Number 2, 97-106
- Deikman J, Petracek M, Jacqueline E, Heard JE (2011) Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. Volume 23, Issue 2, Pages 243–250
- Diab AA, Teulat B, this D, Ozturk NZ, Benscher D, Sorrells ME (2004) Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theor Appl Genet* 109:1417-1425
- Fabre J, Dauzat M, Nègre V, Wuyts N, Tireau A, Gennari E, Neveu P, Tisné S, Massonnet C, Hummel I, Granier C (2011) PHENOPSIS DB: an Information System for

- Arabidopsis thaliana* phenotypic data in an environmental context. *BMC Plant Biology* 11, 77-83
- Flagella Z, Campanile RG, Stoppelli MC, De Caro A, Di Fonzo N (1998) Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO₂-enriched and normal air in cereal species. *Physiologia plantarum* 104: 753-759
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*, Volume 61, Issue 12Pp. 3211-3222
- Forster BP, Ellis RP, Thomas WT, Newton AC, Tuberosa R, This D, el-Enein RA, Bahri MH, Ben Salem M. (2000) The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *J Exp Bot* 51:19-27
- Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y (2004) Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺- ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany* 55:585-594
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11444-11449
- Gill SG, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 48, Issue 12, Pages 909–930
- Golzarian MR, Frick RA, Rajendran K, Berger B, Roy S, Tester M, Lun DS (2011) Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. *Plant Methods* 7, 2-12

- González A, Martín I, Ayerbe L (1999) Barley yield in water-stress conditions: The influence of precocity, osmotic adjustment and stomatal conductance. *Field Crops Research* volume 62, issue 1, Pages 23–34
- Gottwald S, Bauer P, Komatsuda T, Lundqvist U and Stein N (2009) TILLING in the two-rowed barley cultivar 'Barke' reveals preferred sites of functional diversity in the gene HvHox1. *BMC Research Notes* 2009, 2:258
- Guo P, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, von Korff M, Varshney KR, Graner A, Valkoun J (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/erp194
- Hartmann A, Czauderna T, Hoffmann R, Stein N, Schreiber F (2011) HTPheno: An image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. *BMC Bioinformatics* 12, 148-156.
- Hegedűs A, Erdei S, Janda T, Tóth E, Horváth G, Dudits D (2004) Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science* Volume 166, Issue 5, Pages 1329-1333
- Hideg É, Nagy T, Oberschall A, Dudits D, Vass I (2003) Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280–320 nm) stresses. *Plant, Cell & Environment*, Volume 26, Issue 4, pages 513–522
- Houle D, Govindaraju DR, and Omholt S (2010) Phenomics: the next challenge. *Nature reviews Genetics* Volume 11 / 855
- Hundertmark M és Hinch DK (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 2008, 9:118
- Igartua E, Gracia MP, Lasa JM, Medina B, Molina-Cano JL, Montoya JL, Romagosa I (1998) the Spanish Barley Core Collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45:475-482

- Ji X, Dong B, Shiran B, Talbot M, Edlington JE, Hughes T, White RG, Gubler F, Dolferus R (2011) Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals plant physiology, vol. 156 no. 2 647-662
- Jinyou D, Xiaoyang C, Wei L, Qiong G (2004) Osmoregulation Mechanism of Drought Stress and Genetic Engineering Strategies for Improving Drought Resistance in Plants. *Forestry Studies in China* 6:56–62
- Khakwani AA, Dennett MD, Munir M (2011) Drought tolerance screening of wheat varieties by inducing water stress conditions. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 33 (2), 135-142
- Kim JS, Mizoi UJ, Yoshida T, Fujita Y, Nakajima J, Ohori T, Todaka D, Nakashima K, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis* *Plant Cell Physiol.* 52(12): 2136–2146
- Knüpfper H (1988) The European Barley Database of the ECP/GR: An introduction. *Kulturpflanze* 36:135-162
- Lababidi S, Mejlhede N, Rasmussen SK, Backes G, Al-Said W, Baum M, Jahoor A (2009) Identification of barley mutants in the cultivar 'Lux' at the Dhn loci through TILLING. *Plant Breeding* 128:332-336 doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01640.x
- Langridge P, Paltridge N, Fincher G (2006) Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4:343-354
- Levitt J (1972) Responses of plants to environmental stress. Academic Press, N.Y.
- Malatrasi M, Close TJ, Marmioli M (2002) Identification and mapping of a putative stress response regulator gene in barley. *Plant Molecular Biology* 50:143-152

- Marzin s, Mihaly R, Pauk J, Schweizer P (2008) A transient assay system for the assessment of cellautonomous gene function in dehydration-stressed barley *Journal of Experimental Botany* 59:3359-3369
- Mejlhede N, Kyjovska Z, Backes G, Burhenne K, Rasmussen SK, Jahoor A (2006) EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes mlo and Mla of barley. *Plant Breeding* 125:461–467
- Mohammed KA (2004) Improving crop varieties of spring barley for drought and heat tolerance with AB-QTL analysis, Ph.D. thesis, Institute of Crop Science and Resource Conservation, University of Bonn
- Munns R, James RA, Sirault XR, Furbank RT, Jones HG (2010) New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 61, 3499–3507.
- Oberschall A, Deák M, Török K, Sass L, Vass I, Kovács I, Fehér A, Dudits D, Horváth GV (2000) A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stress. *Plant J.* 24:437-446
- Passioura JB (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*, Volume 20 Number 2. 79-83
- Peleman JD, van der Voort JR (2003) Breeding by Design. *Trends Plant Science* 2003 Jul;8 (7):330-4.
- Park SY, Noh KJ, Yoo JH, Yu JW, Lee BW, Kim JG, Seo HS, Paek NC (2006) Rapid upregulation of Dehydrin3 and Dehydrin4 in response to dehydration is a characteristic of drought tolerant genotypes in barley. *Journal of Plant Biology* 49:455-62
- Rahman H, Pekic S, Lazic-Jancic V, Quarrie SA, Shah SMA, Pervez A, Shah MM (2011) Molecular mapping of quantitative trait loci for drought tolerance in maize plants. *Genet. Mol. Res.* 10 (2): 889-901

- Rodriguez EM, Svensson JT, Malatrasi M, Choi DW, Close TJ (2005) Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor and Appl Genet* 110:852–858
- Rohila JS, Jain RK, Wu R (2002) Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley Hva1 cDNA. *Plant Sci.* 163:525–532
- Roncarati R, Salamini F, Bartels D (1995) An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function. *Plant J.* 7: 809-822
- Rong-hua L, Pei-pol G, Baum M, Grand S, Ceccarelli S (2006) Evaluation of Chlorophyll Content and Fluorescence Parameters as Indicators. *Agricultural Sciences in China* 5: 751-757
- Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L et al (2005) Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol Genet Genom* 274:515–527
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M (2011) Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current opinion in plant biology* 14(3):232-9
- Rozen S, Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 132:365-386
- Russell J, Booth A, Fuller J, Harrower B, Hedley P, Machray G, Powell W (2004) A comparison of sequence-based polymorphism and haplotype content in transcribed and anonymous regions of the barley genome. *Genome* 47:389-398
- Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J (2009) Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends in Plant Science* 14, 488-96.
- Schachtman DP, Goodger JQD (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, 13, 281-287

- Shi HZ, Lee BH, Wu SJ, Zhu JK. (2002) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotech.* 21:81–85
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58:221–227
- Shrawat AK, Becker D, Lörz H (2006) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) *Plant Science* Volume 172, Issue 2, Pages 281–290
- Shao HB, Chu LY, Jaleel CA, Zhao CX (2008) Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Plant biology and pathology*, Volume 331, Issue 3, Pages 215–225
- Simsek O, Kacar YA (2010) Discovery of mutations with TILLING and ECOTILLING in plant genomes. *Scientific Research and Essays* Vol. 5 (24), pp. 3799-3802
- Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho TD, Qu R (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.* 155:1–9
- Skirycz A, Inzé D (2010) More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 197-203
- Smirnoff N (1998): Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 214–219
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 627–658
- Taketa S, Amano S, Tsujino Y, Sato T, Saisho D, Kakeda K, Nomura M, Suzuki T, Matsumoto T, Sato K, et al. (2008) Barley grain with adhering hulls is controlled by

- an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4062-4067
- Talamè V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R (2007) Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany* 58:229–240
- Tester M, Langridge P (2010) Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327, 818
- Till BJ, Zerr T, Comai L, Henikoff S (2006) A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals *Nature Protocols* 1, 2465 - 2477
- Till BJ, Zerr T, Bowers E, Greene EA, Comai L, Henikoff S (2006/2) High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. *Nucleic Acids Research* 34 (13): e99.
- Tuberosa R, Salvi S (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops *Trend in Plant Science* 11:405-412
- Turóczy Z, Kis P, Török K, Cserháti M, Lendvai Á, Dudits D and V. Horváth G (2011) Overproduction of a rice aldo–keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification. *Plant Molecular Biology*, Volume 75, Numbers 4-5 (2011), 399-412
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, (46) 1092-1092
- Vogel J, Garvin D et al. (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463, 763-768
- Volaire F (2003) Seedling survival under drought differs between an annual (*Hordeum vulgare* L.) and a perennial grass (*Dactylis glomerata*). *New Phytologist* 160: 501-510

- von Korff M, Grando S, This D, Baum M, Ceccarelli S (2008) Quantitative trait loci (QTL) associated with agronomic performance of barley under drought. *Theor Appl Genet* 117:653-669
- Worch S, Rajesh K, Harshavardhan VT, Pietsch C, Korzun V, Kuntze L, Börner A, Wobus U, Röder MS, Sreenivasulu N (2011) Haplotyping, linkage mapping and expression analysis of barley genes regulated by terminal drought stress influencing seed quality. *BMC Plant Biology* 11:1
- Xia Y, Ning Z, Bai G, Li R, Yan G, et al. (2012) Allelic Variations of a Light Harvesting Chlorophyll A/B-Binding Protein Gene (*Lhcb1*) Associated with Agronomic Traits in Barley. *PLoS ONE* 7(5): e37573. doi:10.1371/journal.pone.0037573
- Xu D, Duan X, B. Wang B, Hong B, Ho THD, Wu R (1996) Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice *Plant Physiology* vol. 110 no. 1 249-257
- Xu ZS, Ni ZY, Li ZY, Li LC, Chen M, Gao DY, Yu XD, Liu P, Ma YZ (2009) Isolation and functional characterization of HvDREB1-a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. *J Plant Res* 122:121-130
- Xue GP, Loveridge CW (2004) HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant Journal* 37:326-339
- Yu S, Liao F, Wang F, Wen W, Li J, et al. (2012) Identification of Rice Transcription Factors Associated with Drought Tolerance Using the Ecotilling Method. *PLoS ONE* 7 (2): e30765. doi:10.1371/journal.pone.0030765

11. Publikációs lista

Az értekezéssel kapcsolatos közlemények:

Cseri A., Cserhádi M., von Korff M., Nagy B., V. Horváth G., Palágyi A., Pauk J., Dudits D., Törjék O. (2011) Allele mining and haplotype discovery in barley candidate genes for drought tolerance. *Euphytica* (2011), Volume 181, Number 3, 341-356

IF: 1,597

Cseri A., Sass L., Törjék O., Pauk J., Vass I. and Dudits D. (2013) Phenotyping of drought responses in combination with haplotyping of stress genes in barley genotype collection. *Australian Journal of Crop Science* (közlésre beküldve)

IF: 1,632

Egyéb közlemények:

Kotormán M., **Cseri A.**, Laczkó I. and L. Simon M. (2009) Stabilization of α -chymotrypsin in aqueous organic solvents by chemical modification with organic acid anhydrides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 59, Issues 1-3, July 2009, Pages 153-157

IF: 2,015

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Prof. Dr. Dudits Dénesnek és Dr. Törjék Ottónak szakmai irányításukért, segítségükért és tanácsaikért. Köszönetet szeretnék mondani Talpas Krisztinának a kísérletek kivitelezése során nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozom Dr. Vass Imrének és Sass Lászlónak a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer fejlesztésében és működtetésben nyújtott segítségéért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Palágyi Andrásnak szakmai segítségéért és lelkesítő támogatásáért. Köszönettel tartozom Dr. Pauk Jánosnak és Dr. Cseuz Lászlónak a fenotipizálási kísérletek során nyújtott segítségükért és fontos tanácsaikért.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak a biztatásukért és támogatásukért.

Az általunk végzett kutatás projekt egy OTKA pályázat támogatásával került megvalósításra folyamatos együttműködésben a Gabonakutató Non-Profit Kft. nemesítőivel.