

Ph.D. értekezés tézisei

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

Cseri András

Témavezetők:

Prof. Dr. Dudits Dénes

Dr. Törjék Ottó

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

SZTE TTIK, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

2013

Szeged

Bevezetés

Jelenleg világszerte és hazánkban is a szárazság stressz az egyik legjelentősebb termés korlátozó tényező a gabonafélék, így az árpa esetében is. Következésképpen a legfőbb nemesítési célok közé tartozik új, fokozottabb szárazság toleranciával rendelkező fajták előállítás. A nemesítés sikeressége nagymértékben függ attól, hogy sikerül-e megértenünk e 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 integrációja. A meglévő természetes genetikai variabilitás meghatározása pedig értékes információval szolgálhat a szárazság tűrésben résztvevő gének funkcióját illetően. Kutatásaink céljai között szerepelt az árpa szárazság tűrésének hátterében álló genetikai faktorok vizsgálata a fenomikai és genomikai megközelítések egyesítésének útján. A genotípus-fenotípus asszociációk együttes vizsgálata lehetővé teheti a vizsgált kandidátus gének szárazság toleranciában betöltött funkciójának megerősítését.

Az árpa szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó kandidátus gének 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 kézés, 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.

Vizsgálatainkhoz a világ számos pontjáról gyűjtött 96 genotípust /termesztett fajtákat, ökotípusokat és vad változatokat/ is tartalmazó, a szárazságtűrés szempontjából variábilis árpa kollekción állítottunk össze. A kandidátus gének kiválasztása során a szárazságtűréssel foglalkozó szakirodalmi adatokra (gén

expressziós illetve QTL térképezési vizsgálatok, transzgenikus kutatások) támaszkodtunk.

Az EcoTILLING reakció magában foglalta a vizsgált génszakasz fluoreszcens nukleotidok jelenlétében végzett PCR-amplifikációját. A kapott ampliconokat a heteroduplex képzés után az egyszálú DNS-re specifikus aktivitással rendelkező Cell-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.

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

Célkitűzés

1. Elsődleges célunk volt az árpa szárazság tűrésében potenciálisan szerepet játszó kandidátus gének természetes genetikai variabilitásának feltárása az EcoTILLING technológia, mint a polimorfizmusok azonosítására alkalmas eszköz alkalmazása útján.
2. 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.
3. Egy árpa genotípus törzskollekció szárazságra adott válaszreakcióinak jellemzése a morfológiai, fiziológiai és agronómiai paraméterek

monitorozása útján kontroll és stressz körülmények között Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer használatával.

4. 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.

Anyagok és módszerek

Növény anyag:

Az EcoTILLING vizsgálatok elvégzéséhez összeállítottunk egy 96 genotípusból álló toleráns és szenzitív genotípusokat egyaránt tartalmazó törzskollekciót. A genotípusokat különféle forrásból gyűjtöttük össze.

Génjelöltek kiválasztása:

A génjelöltek kiválasztása során elsősorban a szárazságtűréssel foglalkozó szakirodalmi adatokra támaszkodtunk. Minden esetben szükséges volt pontos szekvencia információ a primer tervezés érdekében.

Genomiális DNS izoláció:

A genomiális DNS-t 10-14 napos csíranövényekből izoláltuk. Az oldatok koncentrációjának kiegyenlítése után valamennyi mintához ekvimoláris mennyiségben hozzámértünk egy általunk referenciának választott genotípus (GK Rezi) DNS-éből.

Primer tervezés:

Az EcoTILLING vizsgálat során használt primereket a Primer3 szoftver segítségével terveztük az elérhető genomiális illetve mRNS szekvenciák alapján.

PCR reakció és heteroduplex képzés:

Az EcoTILLING reakció első lépése a célrégió amplifikációja. A PCR reakció során fluoreszcens festékekkel jelölt nukleotidokat használtunk. Az ezután következő heteroduplex képzés egy denaturációs és egy reannealing lépés után a mismatch pozíciók egyszálú DNS specifikus nukleáz enzimekkel (Cel1 vagy ENDO-1) történő emésztését foglalja magában.

Fragment detektálás:

A keletkezett hasított fragmentumokat gél alapú szekvenátor berendezésen detektáltuk.

Haplotípusok azonosítása és szekvenálás:

A kapott gélek alapján a vizsgált genotípusokat előzetes haplotípus kategóriákba soroltuk, majd kategóriánként egy-egy mintát megszekvenáltattunk a polimorfizmusok jelenlétének megerősítése érdekében.

Ismételt genotipizálás:

Az ismételt genotipizálás során alkalmazott primereket a rendelkezésünkre álló haplotípus szekvencia információk alapján terveztük. A kiválasztott InDel-ek alapján a potenciálisan funkcionális haplotípusok elkülönítésére alkalmas SSLP markereket terveztünk. A kiválasztott SNP polimorfizmusokat CAPS reakció, Cel1 és ENDO-1 enzimmel végzett hasítás, restrikciós endonukleázzal történő emésztés, illetve SNaPshot jelölés segítségével különítettük el.

A növények vízellátása automatizált öntözéssel:

A növényeket tartalmazó nevelő edények tömege hetente került meghatározásra a komputer által vezérelt mérleg (GSE model 350, 6000±1 g) segítségével. A kijuttatandó öntözővíz mennyiségét a számítógép a tömeg alapján automatikusan kalkulálta, illetve pótolta.

Digitális fényképezés és biomassa meghatározás:

A növényekről 11 különböző oldalnézeti szögből, 32-33°-onkénti automatizált elforgatással készítettünk felvételeket Olympus C-7070WZ digitális fényképezőgép segítségével. A növények fejlődésének monitorozását hetente végeztük.

Levélhőmérséklet meghatározás:

A levelek evaporációs aktivitását a léghőmérséklethez viszonyított levélhőmérsékleti értékek meghatározása útján vizsgáltuk VarioSCAN 3021 ST magas érzékenyséű hőkamera segítségével.

Haplotípus-fenotípus korrelációk keresése:

Zöld biomassa tömeg, illetve termésmennyiség változási paraméterek alapján toleráns és szenzitív genotípus kategóriákat alakítottunk ki, majd megvizsgáltuk az egyes kategóriákon belüli haplotípus frekvenciákat.

Eredmények és értékelésük

- I. Az alkalmazott technológia segítségével mintegy 1,5 millió bázispárnyi szekvencia vizsgálata nyomán 94 egyedi allélvariánszt különítettünk el a 9 génre tervezett 18 ampikon elemzése útján. Egy bázispárnyi eltérést (SNP) 185, inszerció/delécio-t (InDel) pedig 46 esetben azonosítottunk, a polimorfizmusok átlagos gyakorisága 92 bp/SNP illetve 372 bp/InDel volt. Az ampikonok vizsgálata során az azonosított haplotípusok száma 2 és 7 közé esett.
- II. A haplotípus-szekvenciák birtokában 4 kandidátus gén – *Hordeum vulgare* AR-h gene for aldose reductase (HvARH1), *Hordeum vulgare* HVA1 gene (HvA1), *Hordeum vulgare* gene for stress responsive gene protein 6 (HvSRG6), *Hordeum vulgare* 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.

- III. 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 képalkotó eljárások alkalmazásával végeztük, mégpedig digitális fényképezés és hőkamerás képalkotási eljárás alkalmazásával.
- IV. Vizsgálataink során jelentős mértékű korrelációkat találtunk a vizsgált genotípusok termésmennyisége illetve további fontos agronómiai paraméterei között, mint például a harvest index, a vízhasznosító képesség és az ezerszemsúly. Ezen eredmények a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer a használatából fakadó előnyökre hívhatják fel a figyelmet.
- V. A hőkamerás mérések alkalmával a szárazság stressznek kitett növények esetében magasabb levélhőmérsékleti értékeket detektáltunk. A kiválasztott genotípusok esetében a mért levélhőmérséklet és a biomassa produkció között jelentős összefüggés volt kimutatható.
- VI. A meghatározott relatív zöld biomassa tömeg alapján a genotípusokat stressz reakciójuk szerint toleráns és szenzitív kategóriákba soroltuk az biomassa tömeg csökkenés 45 %-os értékét elkülönítő szintként választva. Az analízis során a toleráns és a szenzitív kategóriákba tartozó genotípusok haplotípus összetételében jelentős különbségeket találtunk a *HvA1* gén esetében. A genotípusokat termésstabilitásuk szerinti rangsor alapján szintén toleráns és a szenzitív kategóriákba soroltuk a terméskiesés 55 %-os értékét küszöbszintként alapul véve. A toleráns illetve szenzitív genotípusok haplotípus összetételét összehasonlítva a *HvDRF1* és a *HvNHX1* gén esetében lényeges eltéréseket találtunk.
- VII. 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.
- VIII. A kísérleteink eredményeként rendelkezésre álló fenotípus és haplotípus információkat tartalmazó adatsorok fontos kiindulási pontjai lehetnek a

szárazságtűrésben fontos szereppel rendelkező génvariánsok QTL illetve asszociációs vizsgálatának. A bemutatott vizsgálat megalapozhatja a fenotípusos és a haplotípusos adatok együttes elemzésének alapvető módszertanát az árpa genotípus-függő szárazságtűrésének vizsgálatában.

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

Prezentációk:

Cseri A., Dudits D., Palágyi A., Törjék O. (2008) Szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltek EcoTILLING vizsgálata árpában. NAP BIO "Plant resource" for cereal improvement Hungarian-German Integrated Project Seminar, Mátraháza, november 19-21, 2008

Cseri A., Cserhádi M., Palágyi A., Pauk J., Dudits D., Törjék O. (2008) Allele mining for drought tolerance related genes in barley. Plant ResourceII Final Meeting 2008, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, november 14, 2008

Cseri A., Törjék O., Dudits D. (2009) Allele mining in barley candidate genes for drought tolerance. NAP BIO "Plant resource" for cereal improvement Hungarian-German Integrated Project Closing Seminar, Mátraháza, 18-19 november, 2009

Cseri A., G. Talpas K., Törjék O., Mihály R., Pauk J., Cseuz L., Sass L., Vass I., Dudits D. (2010) Az üvegházi stresszdiagnosztikai eredmények összehasonlítása a szántóföldön tapasztalt stresszválasszal. Mátraházi szeminárium, 2010. november 17-18

Cseri A., Palágyi A., Pauk J., Törjék O., G. Talpas K., Dudits D. (2011) Szárazságtűrésben szerepet játszó génjelöltek EcoTILLING vizsgálata árpában. „Genetikai Műhelyek Magyarországon” Minikonferencia, Szeged, 2011. szeptember 9

Cseri A., Mihály R., Sass L., Pauk J., Vass I. and Dudits D. (2012) Drought response of cereal plants monitored by the complex stress diagnostic system in greenhouse and field studies. BIOCEREAL nyitókonferencia, 2012. március 14.

Cseri A., Mihály R., Sass L., Pauk J., Vass I. and Dudits D. (2012) Bridging genomic and phenomic levels in support of cereal breeding for drought tolerance. Warsaw workshop of european plant phenotyping network 11th of May 2012

Poszterek:

Cseri A., Dudits D. and Törjék O. (2007) EcoTILLING analysis of candidate genes for drought tolerance in barley. Straub napok, November 28-30, 2007, Szeged

Cseri A., Palágyi A., Cserhádi M., Pauk J., Dudits D., Törjék O. (2009) EcoTILLING analysis of drought related candidate genes in barley. Plant Abiotic Stress - from signaling to development, 2nd meeting of INPAS (International Network of Plant Abiotic Stress), 14-17 May 2009, Tartu, Estonia

Cseri A., Palágyi A., Cserhádi M. , Pauk J., Dudits D. ,Törjék O. (2009) EcoTILLING analysis of drought tolerance related candidate genes in barley. New developments in green gene technology; 8th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology

Cseri A., Palágyi A., Pauk J.,Törjék O., Dudits D. (2010) Allele mining and haplotype discovery in barley drought tolerance related candidate genes. Straub napok, 2010, November 28-30, Szeged