

Zárójelentés

OTKA NK72913 sz. pályázat

A hőmérséklet szerepe a gabonafélék kalászolási idejének szabályozásában

Témavezető: Dr. Karsai Ildikó

2008 – 2012

Martonvásár

1. Bevezetés

Kontrollált klímakamrás kísérleteink megerősítették, hogy az árpa egyedfejlődését és így az alapvető földrajzi adaptációs képességét elsődlegesen a vernalizációs igény megléte vagy hiánya, valamint a nappalhossz érzékenység mértéke szabja meg. E két komponens alapján kialakított árpa genotípus csoportokon belül azonban nagy variabilitás mutatkozik az egyedek virágzási idejében, amely alátámasztja az egyéb szabályozó mechanizmusok fontosságát is. E regulációs utak részletesebb vizsgálata azért lényeges, mert az így azonosított egyedfejlődési gének a virágzási idő tudatos módosításának gazdag tárházát jelenthetik. A nemesítő munka során felhasználásukkal lehetőség nyílik a virágzási idő változtatására oly módon, hogy az ne érintse az alapvető földrajzi adaptációs képességet. Változó klimatikus környezeti viszonyaink között ez a tudás nagyban hozzájárulhat a jobb adaptációs képességgel rendelkező fajták gyors előállításához. Mindezek érdekében egyéb környezeti tényezőknek az árpa egyedfejlődésére kifejtett hatását elemeztük; környezeti hőmérséklet, napi fluktuáló környezeti tényezők, fényforrás (fényminőség) szerepeit és a genetikai komponenseket vizsgáltuk részletesebben.

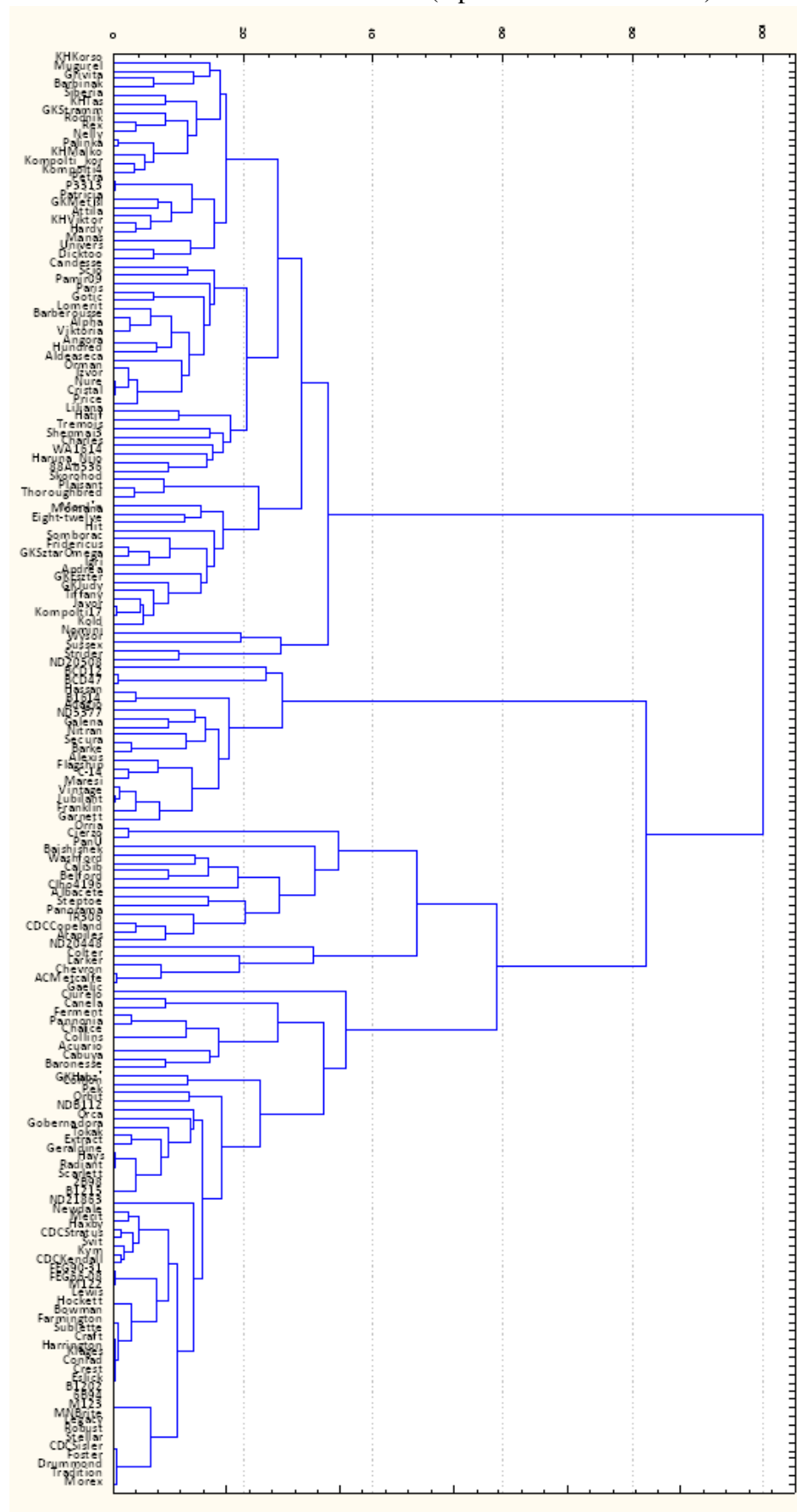
2. Genetikai diverzitás az árpafajta gyűjteményben

2.1 Diverzitás az egyedfejlődési génekben

Vizsgálatainkba 168 különböző eredetű és életformájú árpafajtát vontunk. Ezeket a fajtákat részletesen elemeztük arra vonatkozóan, hogy milyen főbb allél típust tartalmaznak több, az egyedfejlődés genetikai meghatározásában szerepet játszó génben. Ezek a vizsgálatok kiterjedtek a vernalizációs igény géneire (VRN-H1, VRN-H2, VRN-H3, VRT2), a nappalhossz érzékenységi génekre (PPD-H1, PPD-H2), a fotoreceptor géncsaládra (fitokrómok: PhyA, PhyB, PhyC, kriptokrómok: Cry1a, Cry1b, Cry2), a VRN-H3 gént is tartalmazó FT géncsalád két másik tagjára (MFT, TFL1), valamint egy, a fagyállósághoz köthető génre (CBF6). A fajták polimorfizmusát ebben a 15 génben összesen 34 gén szekvencia specifikus primer párral teszteltük.

Az intron1 szabályozás alatt álló VRN-H1 gén esetében nemcsak a vernalizáció kritikus régió játszhat szerepet az egyedfejlődés szabályozásában, hanem az egész, megközelítően 2 – 12 kb hosszúságú intron1 régió. Az intron1 régió makro-szerkezetének tanulmányozása érdekében, a régiót egymással átfedésben lefedő 9 primer párral teszteltük a fajtákat. Ez alapján 10 főbb haplotípust azonosítottunk, amelyből 6 a tavaszi életformához köthető domináns allél. Ezek közül két tavaszi allél gyakorisága haladta meg a 10%-ot a teljes fajtakörben; VRN1-1 a fajták 30,4%-ban, míg a VRN1-3 a fajták 10,7%-ban volt jelen. A vad típusú recesszív őszi allél két méretét mutattuk ki, emellett azonosítottunk két kisebb méretű őszi allélt is. Ezek közül a vad típusú allélok gyakorisága volt jelentős; a vrnH1(5200) a fajták 23,7%-ban, míg a vrnH1(5300) a fajták 16,7%-ban volt jelen. A VRN-H3 gén esetében is 8 szekvencia specifikus primer párt alkalmaztunk, amelyek a gén 5' végi, promóter, intron1, intron2, exon3 és 3' végi szakaszaihoz kötődnek. E 8 primer pár együttes használatával 5 haplotípust különítettünk el, amelyekből a leggyakoribb a fajták 52,4%-ban, míg a legritkább 0,6%-ban fordult elő. A VRN-H2 génnél a funkció alapja árpában a gén jelenléte vagy teljes hiánya. Ez a gén három, szorosan kapcsolt kópiában van jelen. Az általunk alkalmazott két primer pár közül az egyik az a+b kópiát, míg a másik a c kópiát azonosítja. E két primer pár alapján, három típust azonosítottunk; a fajták közel azonos arányában vagy mindhárom kópia hiányzott (48,8%), vagy mindhárom kópia jelen volt (43,5%). A harmadik típusba tartozó fajták (7,7%) csak a c kópiát hordozták.

1 ábra: Árpafajták genetikai diverzitása a 15 egyedfejlődési génre specifikus primerek alkalmazásával (lépték Dlink/Dmax*100)

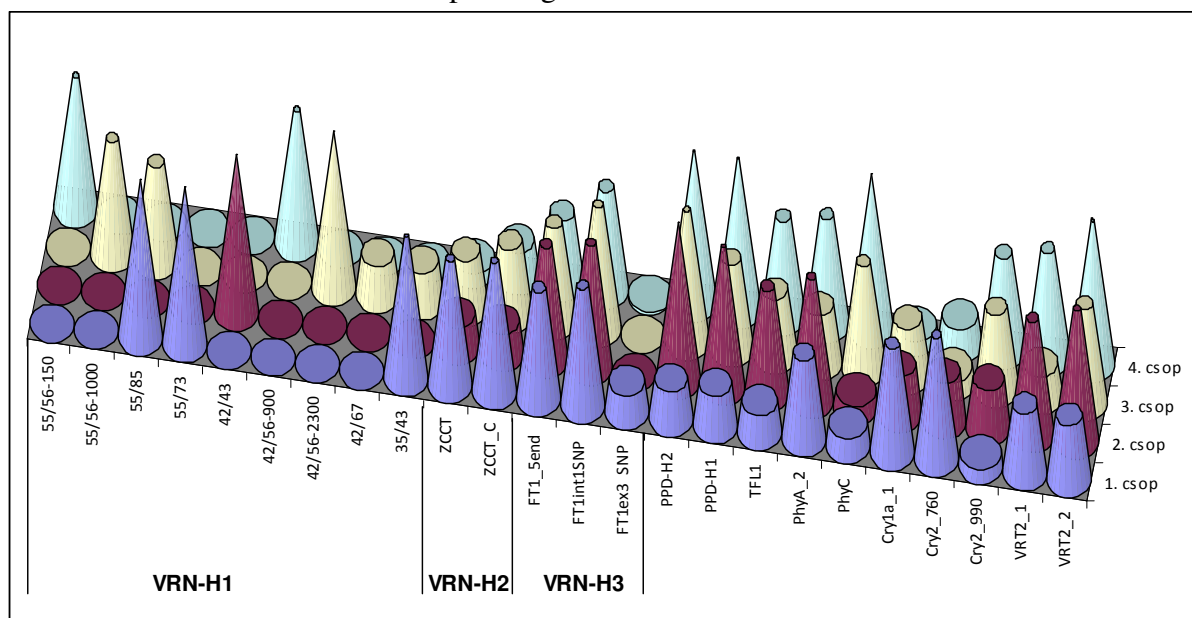


A nappalhossz érzékenységi gének esetében alkalmazott 1-1 primer pár szintén a génfunkcióhoz kötődik közvetlenül; a PPD-H1 esetében az exon7 SNP-hez, míg a PPD-H2 esetében a teljes, működőképes gén jelenlétéhez, vagy hiányához. A leggyakoribb allél kombinációnak a mindkét PPD génben érzéketlen allél jelenléte bizonyult (54,2%), ezt követte a mindkét génre érzékeny allélt tartalmazó fajták csoportja (26,8%), míg a legritkább kombináció a PPD-H1-ben érzéketlen és a PPD-H2-ben érzékeny genotípus volt (7,7%). A többi 10 génnél még nem ismert pontosan a génfunkciót befolyásoló polimorfizmus helye, így ezeknél olyan szekvencia specifikus primereket alkalmaztunk, amelyekkel már korábban mutattak ki különbséget az árpa genotípusok között.

A génspecifikus primerekkel generált 40 markerre alapozott genetikai diverzitás vizsgálat alapján a fajták 4 nagyobb csoportra különültek el (1. ábra). Az 1. csoportba 71 fajta tartozik, amely magába foglalja az őszi és a fakultatív genotípusokat eredettől és kalásztípustól függetlenül. A 2. csoport 19 fajtája többségében két soros tavaszi árpa. A 3. csoportba szintén 19 fajta tartozik, amelyek között a legnagyobb a csoporton belüli variabilitás; őszi, tavaszi és fakultatív fajták is tartoznak ebbe a csoportba és a kalásztípusok is vegyesek. A 4. csoport csak tavaszi életformájú fajtából áll; az ide tartozó 59 fajta többsége Észak-Amerikából származik. E csoportra jellemző az, hogy egyes alcsoportjain belül a genetikai variabilitás mértéke a legkisebb.

Ezek az eredmények alátámasztották, hogy az általunk vizsgált árpa gyűjtemény genetikai diverzitásának alapja az életforma. Ennek megfelelően, a csoportokra jellemző allél összetétel a VRN-H1, VRN-H2 génekben mutatott a legnagyobb eltérést (2. ábra). A VRN-H3 esetében azonban nem volt jelentős különbség az egyes csoportokban kimutatható allél gyakoriságokban egy kivétellel, az exon3 régióban azonosított viszonylag ritkán előforduló SNP polimorfizmus csak az őszi életformájú egyedekben azonosítható. A VRT2 gén esetében a 2. és 4. csoport allél gyakoriságai hasonlóak voltak, míg az 1. és a 3. csoport egymástól is eltérő allél típus gyakorisággal volt jellemezhető.

2 ábra: Génspecifikus markerekre alapozott diverzitás vizsgálatban azonosított főbb árpa csoportok gén allél összetételei



A nappalhossz érzékenység génjeiben (PPD-H1, PPD-H2) az őszi árpák csoportjában (1. csoport) az érzéketlen allél jóval kisebb gyakorisággal fordult elő, mint a többi csoportban. A fotoreceptor gének esetében a PhyA-ra a 3. csoport, a Cry1a és Cry2 génekre az 1. csoport különült el jelentősen a többiektől, míg a PhyC esetében az 1. és 2. csoport valamint a 3. és 4. csoport mutattak egymáshoz hasonló allél gyakorisági összetételt. A gének összességében az 1. és 3. csoport egymástól is, valamint a 2. és 4. csoporttól is jelentősebben eltértek. A 2. és 4. csoport tavaszi életformájú fajtái között a különbség jóval kisebb mértékű volt, az egyes gének allél gyakoriságai többé-kevésbé megegyeztek. Ez alól kivételt a VRN-H1 génen kívül csak a PhyC gén jelentett. A 2. csoport tavaszi fajtáiban az ősziekre jellemző PhyC allél típus fordult elő nagyobb gyakoriságban. A 2. ábrán fel nem tüntetett gének (VRN-H3 egyes marker alléljai, PhyB, Cry1b, MFT, CBF6) allél gyakoriságaiban nem mutatkozott különbség a négy csoport között.

2.2 Átlagos genetikai diverzitás és populáció struktúra

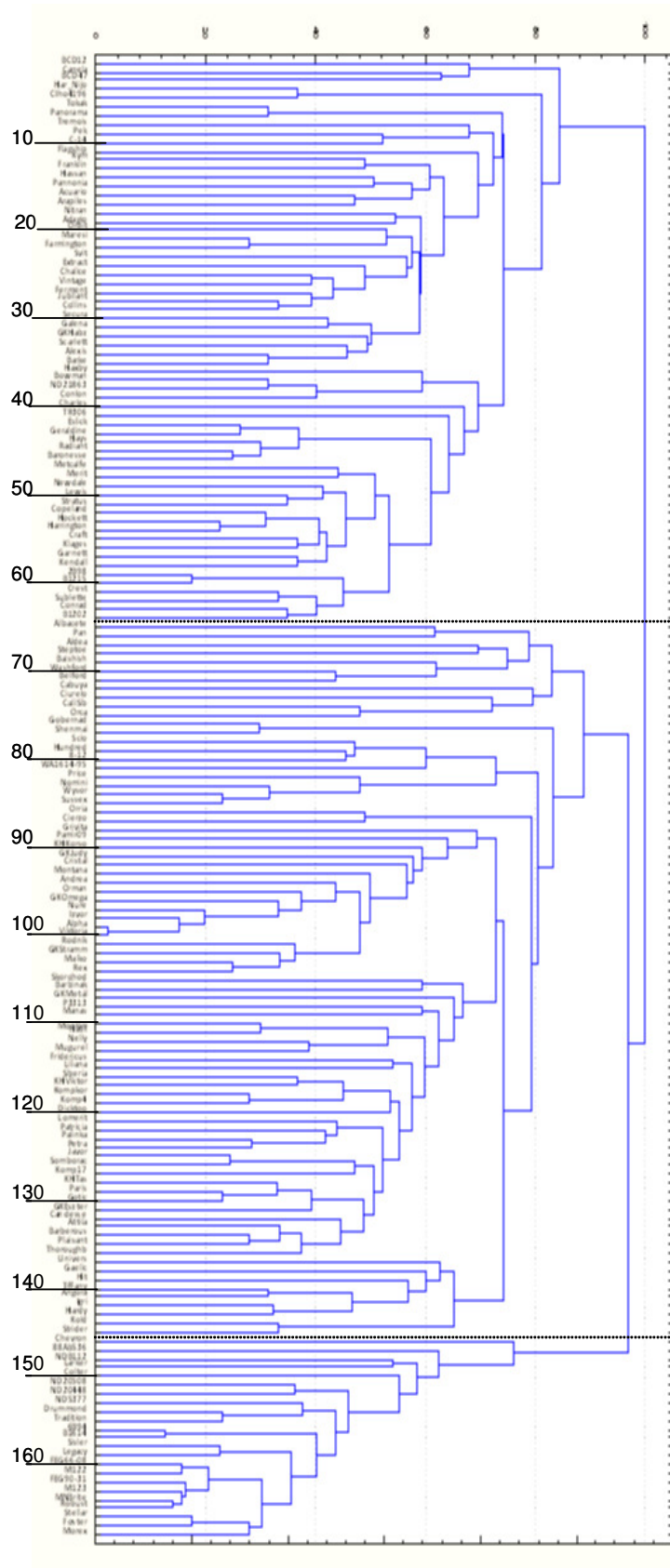
A genetikai diverzitás és a gyűjteményben fennálló populáció struktúra meghatározásához a nagyhatékonyságú DArT marker rendszert használtuk. A fajták közt polimorfizmust mutató 1835 DArT markerből kizártuk a ritka allélokat, amelyek 10%-nál kisebb arányban fordultak elő a fajták körében, valamint az 5%-nál nagyobb hiányzó adatot tartalmazó markereket. Az így visszamaradó 1075 markerből a pontos kromoszómális elhelyezkedés 611 DArT marker esetében ismert. Ezeket a markereket, valamint a gén-specifikus markereket alkalmaztuk a későbbiekben a teljes genomot lefedő asszociációs elemzésekben. Az általános genetikai diverzitás vizsgálatához kiválasztottunk 121 DArT markert, amelyek 5 – 10 cM egyenletességgel fedték le a genomot, és nem mutattak erős szegregációs torzulást a fajták között. Erre a 121 vázmarkerre alapozott klaszter analízis eredményét mutatja a 3. ábra.

A DArT markerekkel alapvetően nagyobb genetikai távolság volt kimutatható a fajták között, mint a génspecifikus markerekkel. Ennek ellenére a két csoportosítási eljárás között szignifikáns, közepes szintű korreláció állt fenn a fajta páronként mért genetikai távolságok összehasonlítása alapján ($r = 0,484^{*****}$).

A DArT markerekre alapozott klaszter analízisben 3 nagyobb csoportot különítettünk el egymástól, amelyek szerveződésében az életformának, a kalásztípusnak és a származási helynek volt alapvető szerepe. Az 1. csoportba tartozó 64 genotípus döntő többsége két soros tavaszi árpa vegyes származási hellyel. Ebbe a csoportba sorolódott 2 fakultatív és egy őszi árpafajta is, de ezek kalásztípusa is két soros. A 2. csoportban 81 fajta található, amely döntő többségben az őszi és fakultatív fajtákat jelenti, származási helytől és kalásztípustól függetlenül. Ide sorolódott 9 tavaszi árpafajta is, amelyeknek többsége azonban az egyedfejlődési génekben tavaszi árpákra szokatlan allél(oka)t tartalmaznak. A 3. csoport a legegységesebb; ez 23 db, 6 soros, észak-amerikai, tavaszi árpafajtából áll átfedő pedigrével. Ez a csoport volt az, amely az egyedfejlődési génekben is a legkisebb variabilitást mutatta.

A populáció struktúra elemzésére a STRUCTURE 2.0 programot használva három határozottan elkülönülő alcsoport (Q klaszterek) bizonyult a legvalószínűbb szerkezetnek. Ez a három csoport egyetlen fajta kivételével teljesen megegyezett a klaszter analízisben azonosított csoportokkal. A populáció szerkezet ismerete a genom széles asszociációs vizsgálatnál nagy fontosságú a szerkezeti eltérésekkel egybeeső és így nagy valószínűséggel hamis marker – tulajdonság asszociációk kiszűrésére.

3 ábra: Árpafajták genetikai diverzitása DArT vázmarkerek alkalmazásával (lépték Dlink/Dmax*100)



2.3 Árpafajta gyűjtemény LD térképe

Az LD térkép, valamint a későbbiekben a genom széles asszociáció céljaira felhasznált DArT és gén specifikus markerek kromoszómális eloszlását, és a kromoszómánkénti populáció struktúráját szemlélteti az 1. táblázat.

1. táblázat: 168 árpafajta LD térképe és a térképre alapozott populáció struktúra jellemzői

	Markerek		Összes cM	Átlagos cM	Átlagos LD csökkenés (cM)			Egyedi kromoszóma markerein és összes markeren alapuló diverzitások közti kapcsolat	
	DArT	Gén spec			168 fajta	tavaszi	Őszi	Korrelációval (r érték)	Párosított T-teszttel (P érték)
1H	79	1	137,6	1,7	7,3	16,5	7,0	0,74	10E-12
2H	101	2	197,6	1,9	2,7	5,4	3,0	0,75	8E-27
3H	98	1	181,3	1,8	3,3	8,1	4,3	0,79	3E-54
4H	35	4	186,4	4,8	9,7	24,8	9,7	0,60	9E-38
5H	92	20	193,0	1,7	6,2	1,9	15,2	0,76	ns
6H	90	5	159,3	1,7	1,7	2,2	3,9	0,64	3E-239
7H	116	7	198,0	1,6	5,1	11,7	6,0	0,71	9E-10
Σ	611	40	1253,2	1,9	5,0	7,3	7,1		

Az egyes kromoszómához kötődő markerek száma 39 és 123 között volt, közel hasonló átlagos rekombinációs távolsággal (1,6 - 1,9 cM). Ez alól kivételt csak a 4H kromoszóma jelentett, ahol a többi kromoszómához közel hasonló rekombinációs távolság a legkisebb marker számmal párosult, amely a markerek közti legnagyobb átlagos távolságot eredményezte. A teljes genomra viszonyított átlagos LD csökkenés (az a távolság a markerek között, ahol a kapcsoltsági egyensúlytalanság már megszűnik, azaz a marker allélok hasadási arányai egymástól függetlenné válnak) a teljes fajtakörben 5 cM, amely azonban nagy variabilitást mutatott kromoszómánként és a főbb életforma csoportonként is. A leggyorsabb LD csökkenés a 6H, a leglassabb LD csökkenés a 4H kromoszómára jellemző a teljes fajtakörben. A fajták a 6H markereiben mutatják a legnagyobb variabilitást, míg a fajták közti legkisebb eltérés a 4H markereire jellemző. A tavaszi fajták nagy hasonlóságot mutattak az 1H, 4H és 7H kromoszómákon (a hasadás nélküli marker blokkok mérete jelentősen nagy), míg az őszi kromoszómák a 5H kromoszómára voltak erősen hasonlóak. Ez a jelenség, valamint a két életformacsoport eltérő marker blokk szerkezete a főbb egyedfejlődési gének rögzülése miatt lehetséges; az 1H kromoszómán található a PPD-H2 nappalhossz érzékenységi gén, a 4H kromoszómán a VRN-H2, és a PhyA, PhyB gének, az 5H kromoszómán a VRN-H1 és a PhyC, és különböző fagyállósági gének, míg a 7H kromoszómán a VRN-H3 és a VRT2 gének lokalizálódnak.

Az LD térkép szempontjából nemcsak az együtt mozgó marker blokkok nagysága meghatározó, hanem a fajták kromoszómánkénti genetikai diverzitási viszonyai összehasonlítva az összes markerrel meghatározott átlagos genetikai diverzitással (1. táblázat). Ha a fajta páronként az egyes kromoszómákon mért genetikai távolsági értékeket összehasonlítjuk az összes markerre alapozott genetikai távolsági értékekkel, látható, hogy kromoszómánként jelentős eltérés mutatkozhat ezek között. Az egyik végletet az 5H kromoszóma képviseli, amelynek markereivel végzett genetikai diverzitás mérés az egyik legszorosabb kapcsolatot mutatta az összes markerre alapozott genetikai diverzitással; sőt az 5H kromoszóma markereivel, valamint az összes markerrel kapott fajta páronkénti genetikai távolsági értékek között a párosított T-teszt nem mutatott szignifikáns különbséget. Ez az eredmény szintén alátámasztja, hogy ebben az árpafajta gyűjteményben a populáció struktúra

egyik fontos alapja az életforma, amelynek egyik fő meghatározó génje a VRN-H1, valamint a fagyállósági gének az 5H kromoszómán lokalizálódnak. A másik végletet a 4H és a 6H kromoszómák jelentik, amelyekkel megállapított genetikai diverzitás a legkevésbé korrelált az összes markerre alapozott genetikai diverzitással. A 6H esetében ehhez még hozzájárult az is, hogy az e kromoszóma markereivel számított fajta páronkénti genetikai távolsági értékek nagyságrendekkel nagyobb mértékben tértek el az összes markerrel számított távolsági értékektől, mint azt a többi kromoszómánál tapasztalni lehetett.

Ezekből az eredményekből eddig egy publikáció jelent meg:

Karsai I, Casas A, Igartua E, Kiss T, Veisz O (2012) Application of phenomics and genome wide association mapping for studying the ambient temperature sensing in barley. In: Bedő Z, Láng L (szerk.) Plant Breeding for Future Generations: Proceedings of the 19th EUCARPIA General Congress. Budapest, 2012.05.21-2012.05.24. pp. 118-121.(ISBN:978-963-8351-39-5)

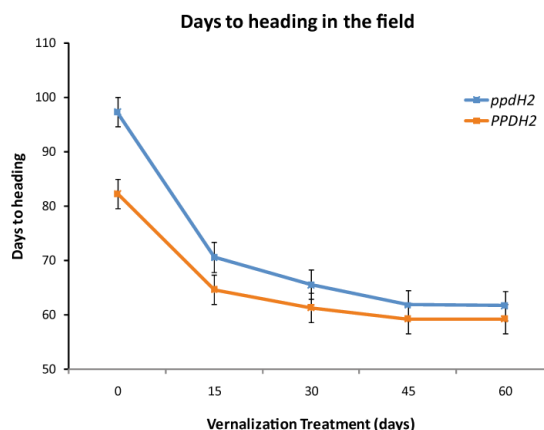
Folyamatban van a következő publikáció készítése:

Karsai I, et al: Allele compositions in major plant developmental genes and their implication on genetic diversity and population structure in barley. Molecular Breeding (in preparation)

3. PPD-H2 nappalhossz érzékenységi gén szerepe

Egy spanyol kutatócsoporttal együttműködésben részletesen elemeztük a PPD-H2 nappalhossz érzékenységi gén (1H) szerepét az egyedfejlődés meghatározásában. A korábbi eredményekre alapozott feltételezések szerint ennek a génnek elsősorban rövid nappalon tulajdonítottak virágzást serkentő hatást. Kísérleteinkben elemeztük, hogy a PPD-H2 gén alléles összetétele hogyan befolyásolja az őszi életformájú árpafajták kalászolási idejét hosszú nappalos körülmények között, amikor a vernalizációs igényük nem vagy csak részlegesen lett telítve. Szignifikáns összefüggést mutattunk ki a PPD-H2 gén és az eltérő vernalizációs kezelés kalászolást befolyásoló hatása között (4. ábra).

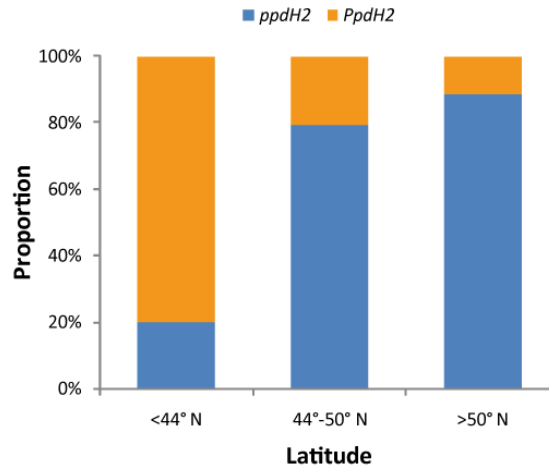
4. ábra: 70 őszi árpafajta kalászolási ideje 0, 15, 30, 45 és 60 napos vernalizációs kezelést (3°C, 9 óras nappalhossz, alacsony fényintenzitás) követő szántóföldi kísérletben; a kiültetés egységesen 2010. március 25-én volt.



A vernalizációs kezelés alapvetően meghatározta a fajták kalászolási idejét. A PPD-H2 alléles összetétele csak a 0 és a 15 napos vernalizációs kezelésben váltott ki szignifikáns

különbséget a fajták kalászolásában; a vad típusú, működőképes gén allél a vernalizáció hiányában vagy részleges vernalizáció mellett jelentősen lecsökkentette a kalászolási időt hosszú nappalon is.

5. ábra: *PPDH2* allél gyakorisági eloszlások 125 őszi árpafajtában a származásuk szélességi övének függvényében. Narancssárga – *PpdH2*, teljes, működőképes gén jelenléte, kék – *ppdH2*, működésképtelen géntörődék jelenléte.



A különböző eredetű őszi árpafajták allél összetételének vizsgálata feltárta, hogy a vad allél előfordulási gyakorisága nem neutrális, hanem erősen függ a fajta eredetének szélességi körétől (5. ábra). Minél délebből származnak a fajták annál nagyobb arányban található meg bennük a vad típusú PPD-H2 allél, amely az északi fajtákban csak egészen kis gyakorisággal mutatható ki. Ez a jelenség az árpa domesztikáció jellegzetességeire, valamint az elterjedési területek eltérő ökológiai viszonyaira vezethető vissza.

Ezekből az eredményekből megjelent publikáció:

Casao, MC, Karsai, I, Igartua, E, Gracia, PM, Veisz, O, Casas, AM (2011) Adaptation of barley to mild winters: A role for PPD-H2. *BMC Plant Biology*, 11:164. **IF₁₁: 3,45**

4. Árpa genotípusok fenológiai vizsgálata különböző környezeti tényezők rendszerében

A pályázat keretében kidolgozott eljárás alapján részletesen tudjuk jellemezni a gabonafélék fenológiai folyamatait a csírázástól, a kalászoláson keresztül a növény teljes magasságának eléréséig; a standardizált eljárás viszonylag nagy mintaszámon (100 – 200 fajta) és különböző nevelési környezetben is egyformán alkalmazható (szántóföldi és kontrollált klímakamrás kísérletek). Ezen belül pontosan meg tudjuk határozni a fontosabb fejlődési fázisokat; bokrosodás kezdete (DEV21) és vége (DEV29), szárcsomó megjelenése (DEV31), intenzív szárnövekedés kezdete (DEV30) és vége (DEVSEend); zászlóslevél megjelenése (DEV37), zászlóslevél teljes kifejlődése (DEV39) kalász hasban (DEV49), teljes növénymagasság elérése (DEVPHmax). Emellett különböző fejlődési paramétereket is elemezni lehet; kileveledés üteme (phyllokron), intenzív szárnövekedés üteme, bokrosodás üteme, végső levél és oldalhajtás szám. Mivel ezek a vizsgálatok érintetlenül hagyják a növényt, a fejlődési jellemzők mérése mellett a termésparamétereket is ugyanazon a növényen tudjuk értékelni. A módszer így kiválóan alkalmas különböző genotípusok összehasonlítására

egy adott környezeti rendszerben, vagy különböző környezeti tényezők adott genotípusra kifejtett hatásának vizsgálatára is. A módszert a következő cikkben publikáltuk:

Kiss, T, Balla, K, Veisz, O, Karsai, I (2011) Elaboration of a non-destructive methodology for establishing plant developmental patterns in cereals. *ACTA AGRONOMICA HUNGARICA* 59:(4) pp. 293-301.

4.1 A fajták környezeti hőmérséklet reakciója

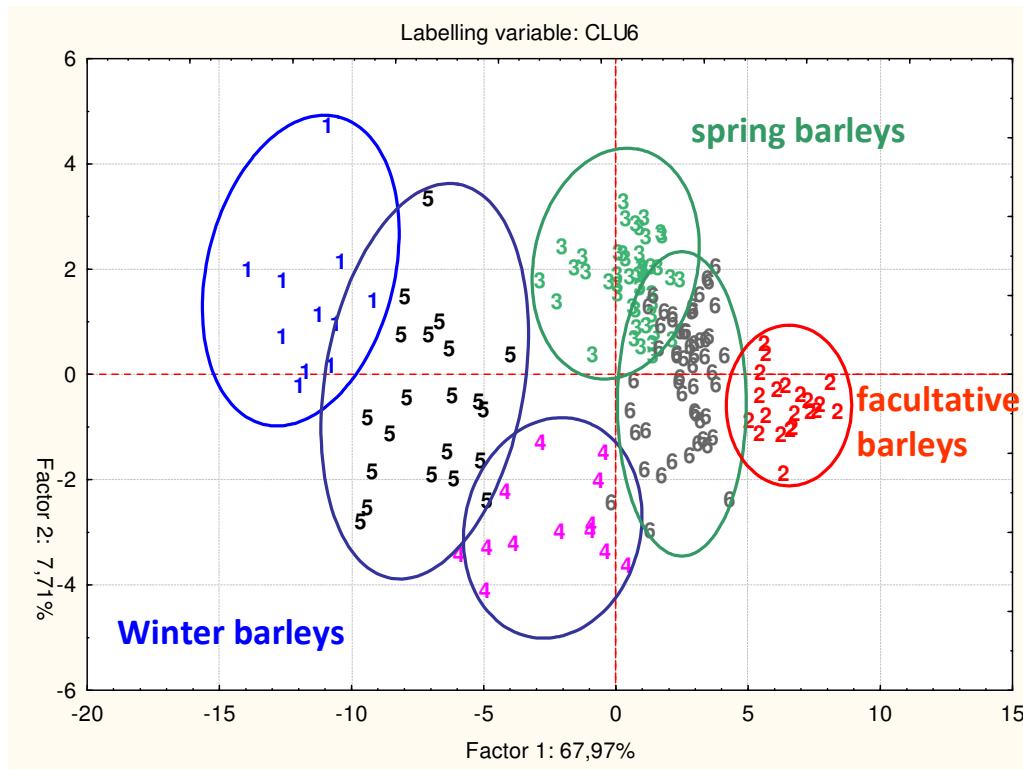
A környezeti hőmérséklet a növény egyedfejlődésének egyik fontos szabályozó komponense. Kalászos gabonafélékben eddig két hatását vizsgálták részletesen és mélységeiben. Az egyik a vernalizációs folyamatokat, a vegetatív és generatív átmenetet kiváltó alacsony hőmérséklet hatása, a másik a növényekre már károsan magas hőmérsékletek, a hőstressz hatása. E két hőmérsékleti szint közötti hőmérséklet tartományok egyedfejlődésre gyakorolt szerepére jóval kevesebb információ áll rendelkezésre, különösen keveset tudunk a hőmérséklet érzékelés fiziológiájáról és genetikájáról. Ennek a kutatási témának az aktualitását a klímaváltozás is megnöveli, melynek következtében a vegetációs periódus során szokatlan hőmérsékleti értékek egyre nagyobb gyakorisággal fordulhatnak elő bármikor, megzavarva ezzel az egyedfejlődés ritmusát és végső soron negatívan befolyásolva a termésképzés menetét. Célunk ezekkel a kísérletekkel az volt, hogy megvizsgáljuk a környezeti hőmérséklet hatását az árpa egyedfejlődésére, meghatározzuk az árpa hőmérséklet reakciójában meglévő természetes variabilitás mértékét, valamint azonosítsuk azokat a genetikai komponenseket, amelyek részt vesznek a környezeti hőmérséklet által kiváltott válaszreakció szabályozásában.

Ennek érdekében a 168 árpafajtás gyűjteményünket vontuk kontrollált klímakamrás kísérletekbe, részletes fenológiai elemzésnek vetve alá őket. A standardizált környezeti feltételrendszerben csak a hőmérsékleti szintben volt különbség a kezelések között, és a növényeket az egyedfejlődés szempontjából teljesen induktív feltételek mellett neveltük fel (telített vernalizációs igény, hosszú nappalos megvilágítás). Négy különböző hőmérsékleti szint hatását elemeztük 13 - 23°C hőmérsékleti tartományban. A genetikai vizsgálatokat a már korábban bemutatott LD térképre alapozott genom széles asszociációs elemzésekkel végeztük el.

A környezeti hőmérséklet szignifikánsan befolyásolta az árpafajták egyedfejlődésének minden paraméterét. A variancia analízisben azonban a genotípus, és a genotípus \times környezeti hőmérséklet kölcsönhatás is szignifikáns tényezőknek bizonyultak, jelezve, hogy árpa genotípusonként eltérő lehet a hőmérsékletre adott válaszreakció. Ennek részletesebb elemzésére a 4 hőmérsékleti szinten, 168 fajtára 9 egyedfejlődési stádiumban meghatározott napi hőösszeg adatmátrixát főkomponens elemzésnek vetettük alá (6. ábra).

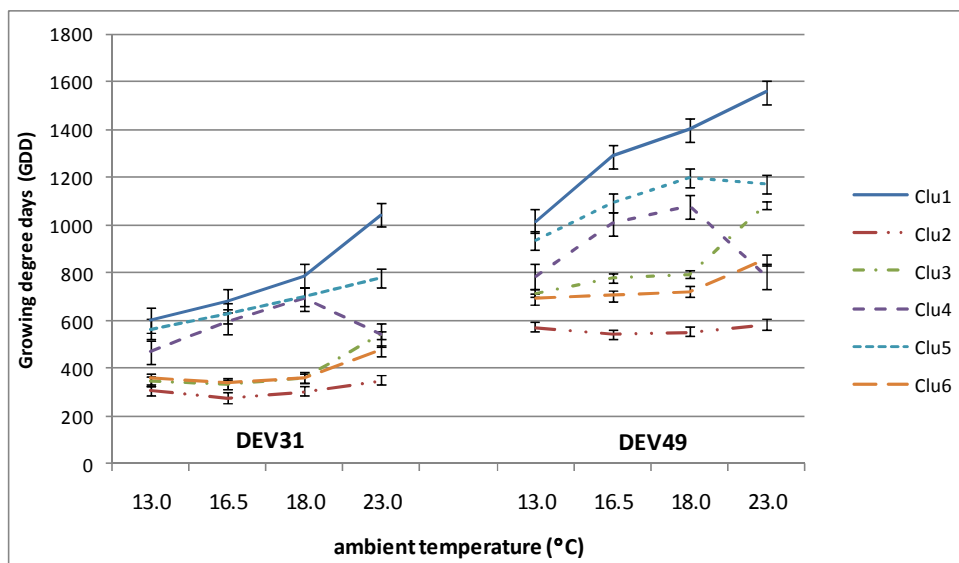
A főkomponens elemzés során az első 5 tényező sajátértéke haladta meg az 1,0-t; amelyek együttesen a fenotípusos variancia 87,0%-át tették ki. Ezen belül az első és a második tényező a fenotípusos variancia 77,7%-át adta. Az első tényező szorosan korrelált a 13C – 18C közti hőmérsékleti szinteken meghatározott fenofázisok napi hőösszegével ($r = -0,85$ és $-0,96$ között). A második tényező a 23C kezelésen mért hőösszegekkel állt szoros összefüggésben ($r = 0,44$ és $0,58$ között). A főkomponens analízis eredményei alapján a fajták 6 határozottan elkülönülő csoportot alkottak, és ez a csoportosulás életforma függőnek bizonyult. A Clu1, Clu4, Clu5 csoportok kizárólagosan őszi árpafajtákból álltak. A Clu3 és Clu6 a tavasziak többségét tartalmazta (néhány őszi és fakultatív genotípussal együtt), míg a fakultatív fajták többsége a Clu2 csoportba tartozott.

6. ábra: 168 árpafajta 9 egyedfejlődési fázisához négy hőmérsékleti szinten meghatározott napi hőösszeg adatmátrixának főkomponens elemzése



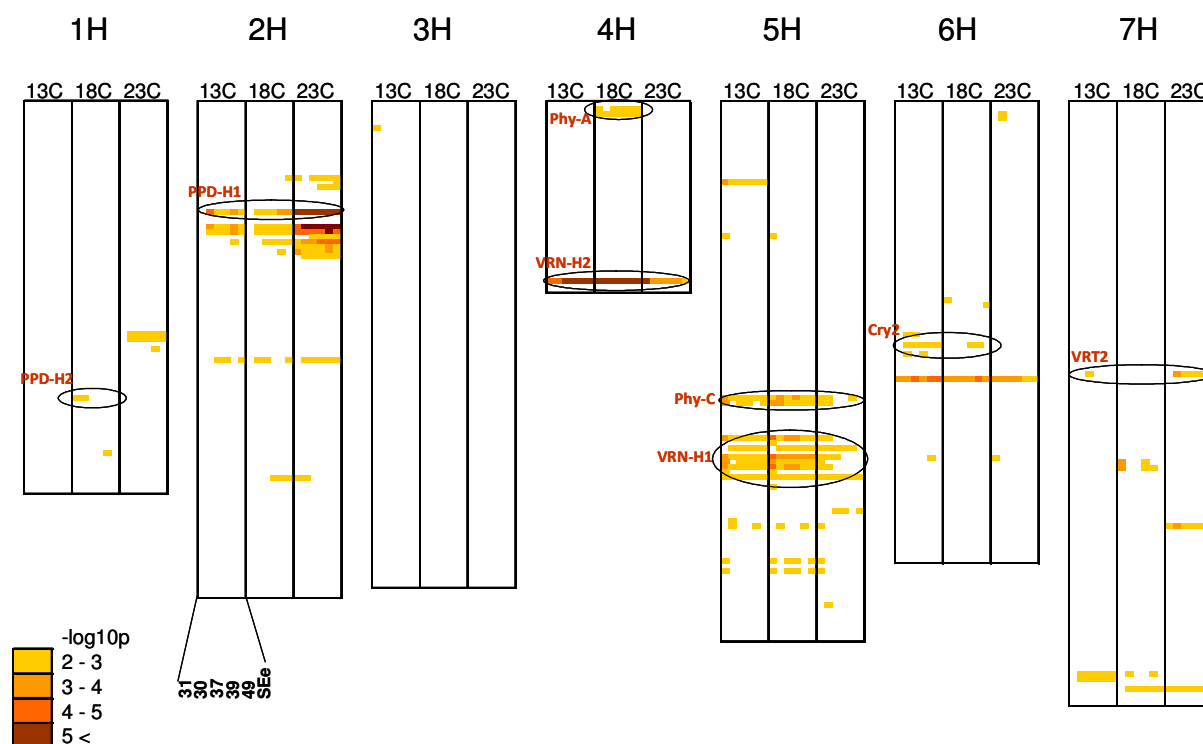
Az így meghatározott csoportok átlagos napi hőösszeg értékeiben szignifikáns különbség állt fenn mind a négy hőmérsékleti szinten (7. ábra). A környezeti hőmérséklet a fakultatív árpák csoportjára (Clu2) gyakorolta a legkisebb hatást. Ez a klaszter bizonyult a leggyorsabb egyedfejlődésűnek mindegyik hőmérsékleti szinten. A tavaszi árpák két csoportja közti különbség viszonylag kismértékű volt a 13C kezelésem és a korai egyedfejlődési stádiumokban. A magasabb környezeti hőmérséklet ezt a különbséget fokozta, így a legnagyobb mértékű eltérést 23C-on mutattuk ki. A Clu6 csoportba tartozó fajták kisebb napi hőösszeget igényeltek, mint a Clu3 fajtái. Az őszi árpák mindhárom csoportjánál az egymást követő egyedfejlődési stádiumok napi hőösszeg igénye közel lineáris növekedést mutatott a 13C – 18C hőmérséklettartományban. Minden esetben a Clu1 fajtái a leglassabb, a Clu4 fajtái a leggyorsabb fejlődésűek voltak, míg a Clu5 fajtákra e kettő közti értékek voltak a jellemzőek. Mint a tavaszi árpafajták esetében, az ősziéknél is a 23C kezelés eredményezte a legnagyobb különbséget a három klaszter reakciója között. A leglassabban fejlődő őszi árpafajták csoportjának egyedfejlődésére a 23C kezelés még jelentősebb késleltető hatást gyakorolt. A Clu5 (köztes fejlődésű fajták csoportja) esetében a 23C kezelés csak a DEV31 korai stádium napi hőösszegét növelte szignifikánsan, de a későbbi fejlődési stádiumokban nem mutatkozott különbség a 18C és a 23C kezelésekből meghatározott napi hőösszegekben. A 23C kezelésem mérték között a legfeltűnőbb reakciót a Clu4 fajtái produkálták; ezeknek a fajtáknak az egyedfejlődése jelentősen felgyorsult a magasabb hőmérsékleten, amelynek mértéke kalászosláskor akkora volt, hogy a koraiság szempontjából a fakultatív csoportot követően a Clu4 került a második helyre, megelőzve a tavasziak két csoportját.

7. ábra: A főkomponens analízissel azonosított 6 árpa egyedfejlődési klaszter napi hőösszeg igénye a DEV31 (száracsomó megjelenése) és DEV49 (kalászolás) fejlődési stádiumokban a négy különböző környezeti hőmérséklet szinteken



A hőmérsékletérzékelésben szerepet játszó genetikai komponensek azonosítása érdekében az árfajta gyűjteményben rendelkezésre álló 611 DaRT és 40 gén-specifikus markerből álló LD térképet használtuk fel a marker – tulajdonság asszociációk teljes genomra kiterjedő elemzésére. Az asszociációs vizsgálatokat a TASSEL 3.1 programcsomaggal végeztük el az MLM (Mixed Linear Model) eljárást a Kinship mátrixra és a Kinship + a populáció struktúra elemzéséből származó Q mátrixra együttesen lefuttatva. A populáció struktúra tanulmányozásakor kimutatott egyedi kromoszómánkénti variabilitás miatt ezeket az elemzéseket az összes térképezett markerre, valamint az egyedi kromoszóma markerekre külön-külön elvégeztük, és ezek főátlagát fogadtuk el tényleges hatásként.

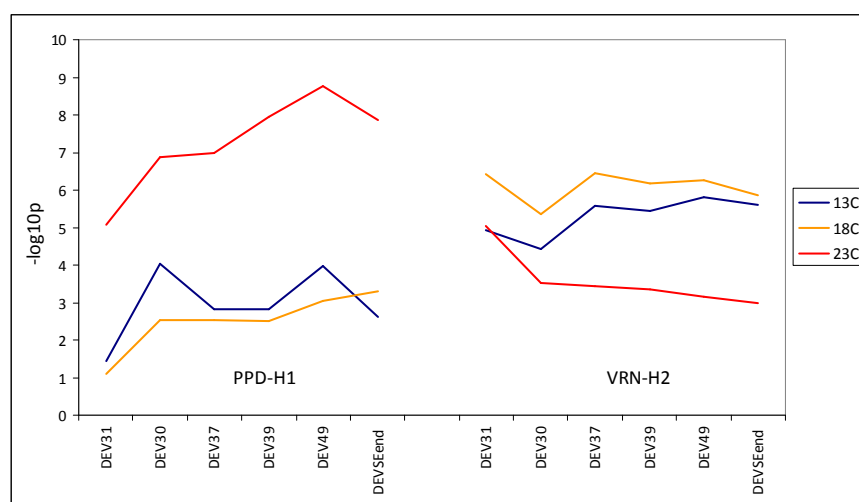
8. ábra: A hőmérséklet érzékelés teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálata árpában



A teljes genomra kiterjedő asszociációs elemzés eredményeképp számos kromoszóma régiót azonosítottunk, amelyek szignifikáns komponensei voltak a különböző hőmérsékleti kezeléseken meghatározott egyedfejlődési fázisoknak (8. ábra). Ezek között voltak hőmérséklet specifikusak, fejlődési fázis specifikusak és olyanok is, amelyek az egyedfejlődés teljes menetét befolyásolták a hőmérséklettől függetlenül. Néhány szignifikáns régió egybeesést mutatott a már ismert egyedfejlődési génekkel. A vernalizációs igény génjei közül a VRN-H1, VRN-H2, és a VRT2, a nappalhossz érzékenység génjei közül a PPD-H1 és kisebb mértékben a PPD-H2, míg a fotoreceptor géncsaládból a PhyA, PhyC és a Cry2 gének szignifikáns hatásai váltak mérhetővé.

A mért asszociációk közül a legszorosabb fenotípusos hatásokat a PPD-H1 és VRN-H2 gének allél szerkezetével összefüggésben határoztuk meg. E két gén további részletesebb vizsgálata feltárta, hogy jelentős különbség van közöttük a hőmérséklet és egyedfejlődési fázis kapcsolat rendszerében (9. ábra). A PPD-H1 gén alléles összetétele által eredményezett variancia 85,6%-a a környezeti hőmérséklettel, 12,4%-a a fejlődési fázissal függött össze szignifikánsan. Ez a gén különösen 23°C-on volt az egyedfejlődés legnagyobb hatású komponense, az egyedfejlődés előrehaladtával egyre fokozódó mértékben. A VRN-H2 génre a környezeti hőmérséklet szintén szignifikáns hatást gyakorolt a variancia 80,0%-át magyarázva; viszont a fejlődési fázis, mint főtenyező nem bizonyult szignifikáns hatásúnak, csak a környezeti hőmérséklettel fennálló kölcsönhatásában. A VRN-H2 a 13 és 18°C kezeléseken volt az egyedfejlődés fő meghatározó komponense, ezeken a hőmérsékleteken a hatása az intenzív szárnövekedés kezdetét leszámítva viszonylag hasonló mértékű volt az összes többi fejlődési fázisra. A VRN-H2 szerepe 23°C-on jelentősen lecsökkent és itt már elsősorban az első szárcsomó megjelenésére (DEV31) gyakorolt nagy hatást.

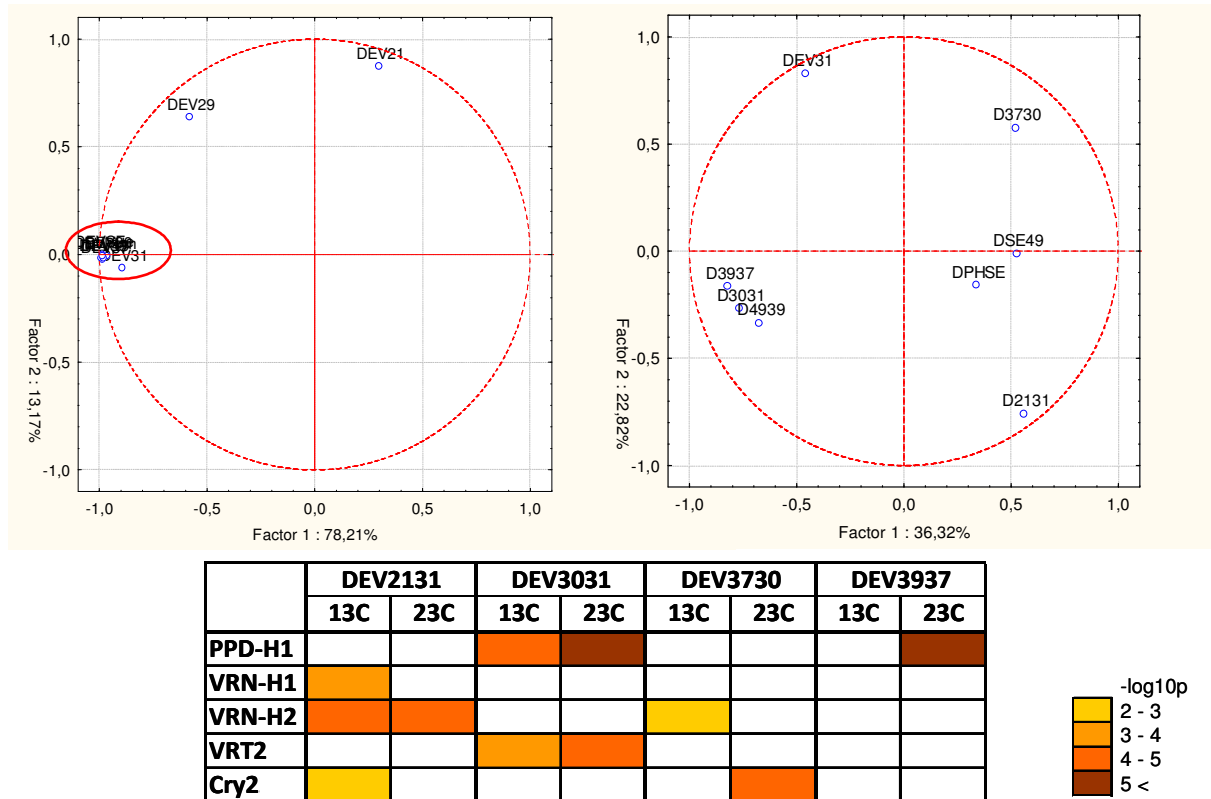
9. ábra: PPD-H1 és VRN-H2 gének környezeti hőmérséklet és fejlődési fázis függő hatásai az árpa egyedfejlődésére



Az egyedfejlődés egyes fázisai szabályozásában szerepet játszó genetikai komponensek elkülönítését megnehezíti, hogy az egyes fejlődési fázisok eléréséhez szükséges napi hőösszegek egymásra épülnek és összeadódnak. Ezt jelzi a 168 fajtára végzett főkomponens elemzésben a fejlődési fázisok szoros csoportosulása is a bokrosodás kezdete (DEV21) és vége (DEV29) kivételével (10. ábra). Ennek a problémának a kiszűrésére jó módszer, ha a két egymást követő fázis között eltelt időintervallum hőösszegeit vonjuk elemzésbe. Az így végzett PCA alapján a fázis intervallumok jól elkülönülnek egymástól, ami alapján feltételezhető, hogy részben eltérő genetikai szabályozás alatt állhatnak. A fázis intervallumok

hőösszegein kivitelezett genom széles asszociáció alapján több gén szabályozó szerepének azonosítása is pontosabbá vált. Így bebizonyosodott, hogy a VRN-H2 alapvetően a szárcsomó megjelenése stádiumig játszik szerepet az egyedfejlődés szabályozásában a környezeti hőmérséklettől függetlenül a 13 – 23°C intervallumban. A PPD-H1 az intenzív szárnövekedés kezdetét befolyásolja a környezeti hőmérséklet emelkedésével párhuzamosan egyre nagyobb súllyal; a magasabb hőmérsékleten már nemcsak az intenzív szárnövekedés kezdetére, hanem az intervallumára is hatással van.

10. ábra: Egymást követő fejlődési fázisok közti intervallumok főkomponens és genom széles asszociációs elemzése



Ezekből az eredményekből elkészült publikáció:

Karsai, I, Igartua, E, Casas, AM, Kiss, T, Sóos, V, Balla, K, Bedő, Z, Veisz, O (2012) Developmental patterns of a large set of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars in response to ambient temperature. J Agron Crop Sci (submitted). IF₁₁:2,43

Folyamatban van a következő publikáció készítése:

Karsai I, et al: Genetic determinants of ambient temperature sensing in barley assessed via genome wide association studies

4.2 Napi fluktuáló tényezők szerepe

A napi fluktuáló környezeti tényezők alatt egyrészt a fényciklust, másrészt a hőmérsékleti ciklust értjük, amelyek ritmikus ismétlődést mutatnak az egymást követő napok során. Két árpa térképező populáció (Dicktoo × Morex, Dicktoo × Kompolti korai) szülői vonalainak vizsgálatakor bebizonyosodott, hogy a fajták kalászosítását e ciklikusan ismétlődő tényezők jelentősen befolyásolhatják önmagukban és egymással kombinálva. E jelenség genetikai hátterének tanulmányozására mind a két térképező populációt vizsgálatba vontuk, tesztelve a

konstans környezeti feltételrendszer (folyamatos megvilágítás és állandó optimális hőmérséklet), a hosszú nappalos formában (16 órás) biztosított napi fényciklus, valamint a napi fényciklus mellett alkalmazott napi hőmérséklet ciklus szerepét. A Dicktoo × Morex fakultatív × tavaszi árpa populáció a VRN-H1, VRN-H3, PPD-H1 és PPD-H2 gének funkcionális alléljeiben mutat polimorfizmust, míg a Dicktoo × Kompolti korai fakultatív × őszi árpa populáció a VRN-H2 génre hasad. Mindkét populációban a virágzási idő nagymértékben lerövidült a konstans környezeti tényezők alkalmazásával. A napi hőmérséklet ciklus vagy a napi fényciklus külön történő alkalmazása szignifikánsan késleltette a virágzást, de a legnagyobb arányú virágzás késleltetést a napi fény és hőmérséklet ciklus együttes alkalmazása váltotta ki. A VRN-H1, VRN-H2, PPD-H1 és PPD-H2 gén allélek és a kölcsönhatásaik szignifikánsan befolyásolták a virágzási idő változásait. Az együttesen alkalmazott fény és hőmérséklet ciklusnál a Dicktoo (recesszív) VRN-H1 allél szignifikánsan későbbi kalászolást eredményezett, mint a Kompolti (recesszív) vagy a Morex (domináns) allél. A Dicktoo típusú VRN-H1 allél a PPD-H1 és a PPD-H2 gének késői virágzású alléljával társulva vezetett a legnagyobb mértékű kalászolás késleltetéséhez. Az együtt alkalmazott fény és hőmérséklet ciklus megváltoztatta a VRN-H1 és VRN-H2 gén allélek közti kölcsönhatást is; ezen a környezeti feltételrendszeren a Dicktoo típusú VRN-H1 allél késői kalászolást eredményezett a VRN-H2 alléles összetételétől függetlenül.

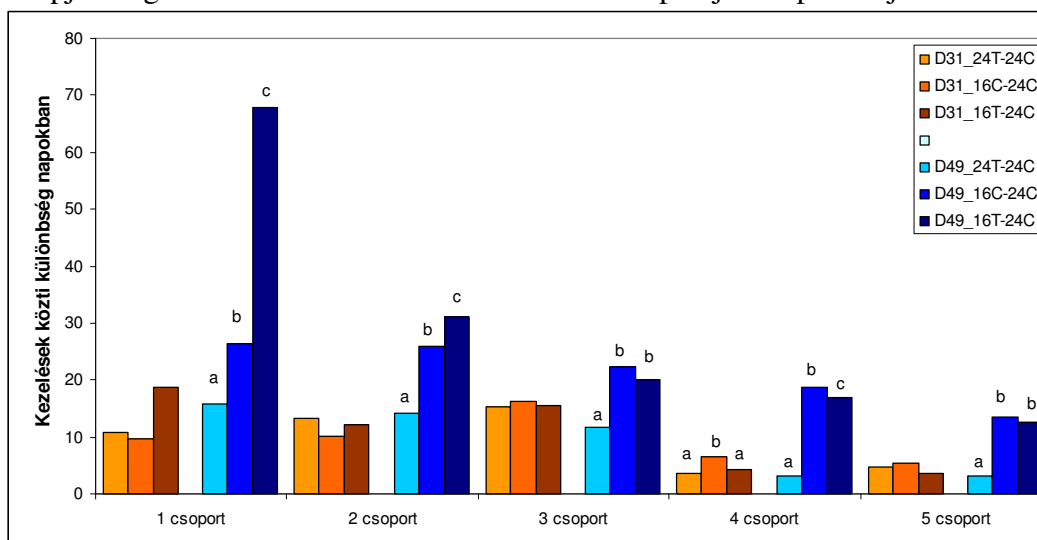
A napi fluktuáló környezeti tényezők egyedfejlődésre kifejtett hatását tanulmányoztuk a 168 árpafajta gyűjteményünkben is, egyrészt a természetes variabilitás mértékének, másrészt az esetleges egyéb genetikai komponensek meghatározása érdekében. A variancia analízisben a fajtahatás minden esetben erősen szignifikánsnak bizonyult. Annak ellenére, hogy a DEV49 stádiumban közel kétszer nagyobb volt, mint a DEV31-ben, a fajtahatás hasonló tendenciát mutatott mindkét stádiumban (2. táblázat). A fajtahatás, mint főtenyező nagyobb szerepet töltött be a konstans hőmérséklet vs. napi hőmérséklet ciklus összehasonlításában mindkét nappalhosszon, mint amikor a konstans fény vs. napi fény ciklust hasonlítottuk össze. A kezeléshatás jóval nagyobb különbséget mutatott a két fejlődési stádium között, amely elsősorban nagyságrendi különbségekben jelentkezett. Mindkét stádiumban a 16 órás nappalhosszon a konstans és a napi hőmérséklet ciklus közti különbség, mint kezeléshatás volt a legkisebb arányú, míg a konstans fényviszony mellett alkalmazott konstans vs. fluktuáló hőmérsékleti kezelés hatása közel azonos volt. Amíg azonban a DEV31 esetében a 24C/16C valamint a 24C/16T közel azonos nagyságrendű volt, addig ezek az értékek nagyságrenddel nagyobbak voltak a DEV49 stádiumban. Ugyanígy a fajta x kezelés kölcsönhatások szerepe is felerősödött a későbbi stádiumra. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a napi fluktuáló tényezők, mintegy additív hatásként összegyűlve az egyedfejlődés előre haladtával egyre nagyobb hangsúlyt kapnak és a fajta reakcióban is egyre nagyobb egyedi különbségek azonosíthatók.

2. táblázat: Konstans környezetben vs. különböző fluktuáló tényezők környezetében mért első szárcsomó (DEV31) és kalászolás (DEV49) stádiumok variancia analízise a 168 árpafajta gyűjteményben

Tényező	df	DEV31 MS				DEV49 MS			
		24C/24T	16C/16T	24C/16C	24C/16T	24C/24T	16C/16T	24C/16C	24C/16T
Fajta	167	617***	688***	483***	406***	1073***	1371***	907***	651***
Kezelés	1	6694***	304***	9503***	4518***	6096***	15**	58203***	33775***
(F) x (K)	167	44***	24***	33***	52***	51***	113***	46***	81***
Hiba	336	2	2	2	1	1	2	2	2
Különbség (napok)		6,3	-1,3	7,5	6,2	6,0	0,3	18,6	18,9

A teljesen konstans környezetben és a különböző napi fluktuáló tényezők környezetében mért értékek különbségeire alapozott többváltozós eljárásokkal 5 alapvető reakciótípust nyújtó fajtacsoportot különítettünk el. (11. ábra). Az első csoportba 5, a 2. csoportba 21, a 3. csoportba 14, a 4. csoportba 77, míg az 5. csoportba 50 fajta tartozott. Az első 3 csoport többségében őszi árpákból állt, bár az 1. csoport kivételével a másik kettő tartalmazott néhány fakultatív és tavaszi árpafajtát is. A 4. és 5. csoport többségében tavasziakból állt, de mindkettőben megtalálható volt néhány őszi árpafajta is. A csoportokon belüli DEV31 értékek nem mutattak szignifikáns különbséget egy kivétellel; a 4. csoportnál a fényciklus önmagában történő bevezetése szignifikánsan nagyobb mértékben késleltette a DEV31-t, mind a többi kezelés. A DEV49 esetében a fajta csoportok közti reakciók azonban jelentős variabilitást mutattak. Az 1. és 2. csoport esetében a hőmérséklet ciklus, a fényciklus, és a hőmérséklet + fényciklus bevezetése szignifikánsan és egyre erősebben késleltette a kalászosítást. A két csoport között jelentős eltérés a hőmérséklet + fény ciklus késleltető hatásában mutatkozott; Az 1. csoport kalászosítását ez a kombináció jóval nagyobb arányban késleltette, mint a 2. csoportét. A 3. és az 5. csoport reakció típusa mutatott még egymással hasonlóságot, amennyiben az önálló hőmérséklet ciklus szignifikáns késleltető hatását jelentősen felülmúlta az önálló fényciklus késleltető hatása, de a hőmérséklet + fény ciklus hatása már nem tért el szignifikánsan az önálló fény ciklustól. Ezeknek a változásoknak a mértéke a 3. csoportnál volt a nagyobb. A 4. csoport reakciója egyedinek bizonyult, mivel itt a hőmérséklet + fény ciklus együttes hatására a kalászosítási idő szignifikánsan csökkent az önálló fény ciklus alkalmazásához képest. Ebben a vizsgálatban a Dicktoo a 2. csoportba, míg a Morex és a Kompolti korai az 5. csoportba sorolódott.

11. ábra: Különböző napi fluktuáló tényezők rendszerében mért fejlődési stádiumok alapján végzett klaszter analízisben kimutatható árpafajta csoportok jellemzői



Következő lépésként a genom széles asszociációs vizsgálatot tervezzük a fajták LD térképén.

A térképező árpa populációk három szülőjét, a fakultatív Dicktoo, a tavaszi Morex és az őszi Kompolti korai fajtákat részletes vizsgálatba vontuk azzal a céllal, hogy meghatározzuk a különböző fluktuáló napi tényezők hatását a főbb egyedfejlődési gének génexpressziós mintázatában esetlegesen mutatkozó napi fluktuációra. Ennek érdekében a napi fény és hőmérséklet ciklusok különböző kombinációjából 4 környezeti kezelést állítottunk be; (1) folyamatos megvilágítás, állandó hőmérséklet (24C), (2) folyamatos megvilágítás napi 16 órás ritmusban fluktuáló hőmérséklet (24T), (3) napi 16 órás fény ciklus, állandó hőmérséklet

(16C), (2) napi 16 órás fényciklus, fluktuáló hőmérséklet (16T). A mintavételezés megkezdése előtt a fajták növényeit vernalizálatlan, és vernalizált változatban 14 – 14 napig neveltük. A mintavételezésre 2,5 napig 3 óránként került sor a ciklusidők megközelítő mérhetősége érdekében. A begyűjtött levélminták feldolgozása (RNS izolálás, cDNS írás, RT-PCR az 5 egyedfejlődési főgénre) befejeződött, az eredmények kiértékelése és értelmezése folyamatban van.

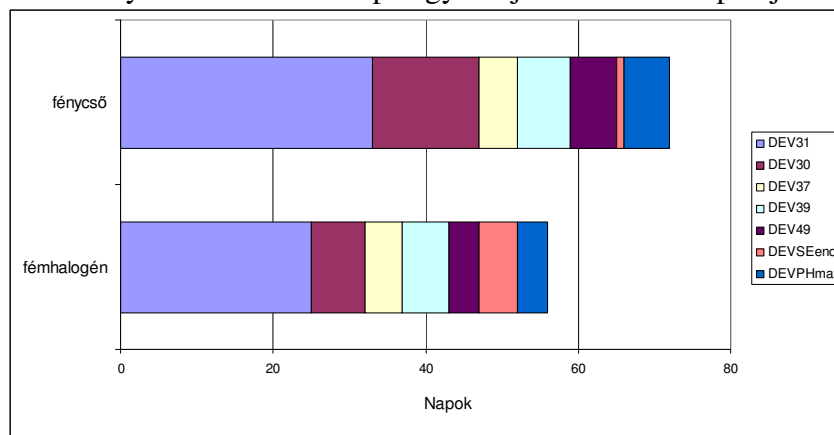
Ezekből az eredményekből megjelent publikáció:

- Karsai, I., Szűcs, P., Kőszegi, B., Hayes, P.M., Casas, A., Bedő, Z., Veisz, O. (2008) Effects of photo and thermo cycles on flowering time in barley: a genetical phenomics approach. *J. of Exp. Bot.*, 59:2707-2715. **IF₀₈: 4,001**
- Karsai, I., Szűcs, P., Hayes, P.M., Kőszegi, B., Bedő, Z., Veisz, O. (2010) Vernalization-independent regulation pathway of the *VRN-H1* vernalization response locus. In: Ceccarelli, S. and Grando, S. (eds) Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium, 5-10 April 2008, Alexandria, Egypt. ICARDA, PO Box 5466, Aleppo, Syria pp 190-198. ISBN 92-9127-246-9
- Karsai, I., Kőszegi, B., Mészáros, K., Bedő, Z., Veisz O (2010) Plant developmental patterns and environmental adaptation in barley. 60. Tagung der Vereinigung der Pfl anzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 24-26 november 2009, 19-24. ISBN: 978-3-902559-37-1

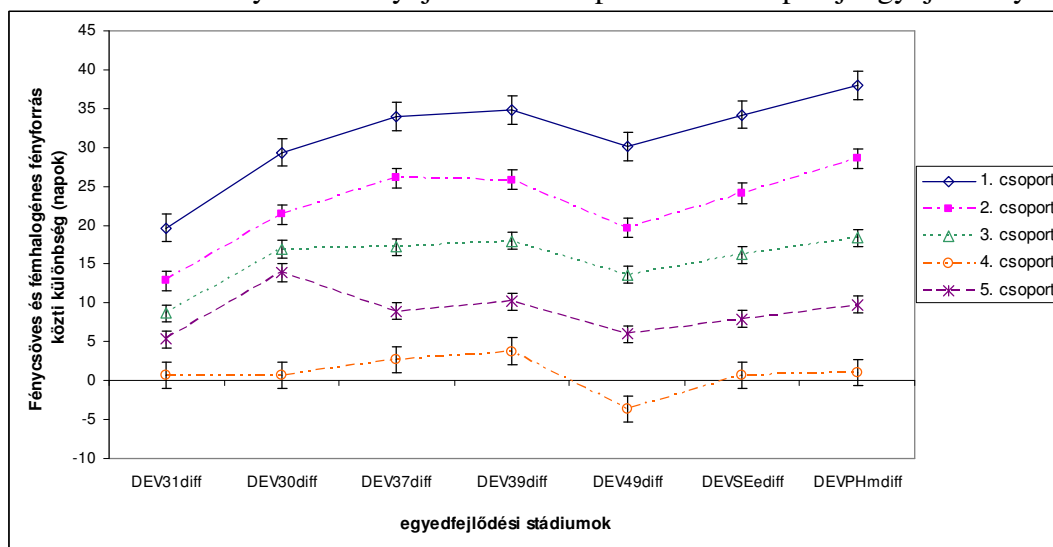
4.3 Fényforrás egyedfejlődést befolyásoló hatása

A kontrollált klímakamrákban használatos különböző típusú fényforrások a fény spektrális összetételében jelentős eltérést mutatnak egymástól, és a természetes napfénytől is. A lúdfű esetében már részletesen tanulmányozták, hogy a különböző fény spektrumok hogyan hatnak a növény növekedésére, fejlődésére, árnyék elkerülésére, és hogy e fenotípusos változások mögött milyen gén expressziós változások állnak. Bebizonyosodott, hogy a fény minőségi összetétele, a kék, vörös és távoli vörös fénytartományok mennyisége és arányai alapvetően megszabják az egyedfejlődést és a fagyállóságot is. Gabonafélékben azonban jóval kevesebb eredmény található erre a jelenségre. 18 árpafajtával végzett előkísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a fényforrás szignifikánsan befolyásolja az árpák kalászását is. A fémhalogén megvilágításon volt alapvetően a legrövidebb a kalászási idő, de ettől nem tért el jelentősen a fénycső + izzó együttes alkalmazása sem. A csak fénycsőes megvilágítás azonban jelentősen késleltette az árpák kalászását. Az is bebizonyosodott, hogy a fajták eltérnek egymástól a fényminőséggel szembeni érzékenységükben.

E jelenség további részletes elemzése céljából összehasonlítottuk a 168 árpafajta kör egyedfejlődését két eltérő fényforrás – fémhalogén és csak fénycsőes megvilágítás - alkalmazása mellett, teljesen induktív standard körülmények között. Mindkét fényforrás esetében a fényspektrum jelentősebb része az 530 – 650 nm (zöld – sárga) hullámhossz tartományba esett. Két jelentősebb eltérés azonban megfigyelhető volt a két fényforrás között. A fénycső megvilágításnál két szignifikáns csúcs mutatkozott a kék fény tartományban (400 és 430 nm), ami hiányzott a fémhalogén fényforrásnál. Ezzel szemben a fémhalogén lámpák a távoli vörös fénytartományban (820 nm) képeztek egy kiugró csúcsot, amely hiányzott a fénycső spektrumából. E két fényforrás szignifikánsan befolyásolta az árpák egyedfejlődését a nagyobb fajtszám mellett is. A 168 árpafajta átlagában a fémhalogén lámpa jelentősen felgyorsította az egyedfejlődés ütemét a fénycsőhöz viszonyítva (12. ábra). A legnagyobb különbség a két fényforrás között a szárba indulás (DEV31) és az intenzív szárnövekedés kezdete (DEV30) fázisaiban mutatkozott. A későbbi fejlődési fázisok intervallumai közel hasonlóak voltak.

12. ábra: A fényforrás hatása az árpa egyedfejlődésére 168 árpafajta átlagában

A variancia analízis alapján a genotípus tényező is erősen szignifikáns hatást mutatott, jelezve a fajtareakciókban fennálló különbségeket. A többváltozós elemzések négy egyedi fajta reakció mellett 5 nagyobb csoportot különítettek el az árpa genotípusok fényforrásra nyújtott érzékenysége szerint (13. ábra). Az 1. és 2. csoportba 13 - 13 fajta, a 3. csoportba 55, a 4. csoportba 12, míg az 5. csoportban 71 fajta tartozott. Ezek a csoportok közepes szintű korrelációban álltak az életformával ($r = -0,422^{***}$); az 1. és 2. csoport néhány kivételtől eltekintve többségében őszi és fakultatív fajtákat tartalmazott, a 3 csoportban az őszi és a tavasziak aránya közel hasonló volt, míg a 4. és 5. csoportot többségében tavasziak alkották.

13. ábra: Eltérő fényforrásra nyújtott reakció típusok a 168 árpafajta gyűjteményben

A 4. csoport volt az egyetlen, amelynek az egyedfejlődését a fényforrás nem befolyásolta jelentősen. Az összes többi csoport fejlődése a fénycsőves megvilágításon szignifikánsan későbbi volt; a csoportok közötti különbség az egyes fejlődési fázisokban bekövetkezett késleltetés mértékében jelentkezett. Ezeknél a csoportoknál egységesen a DEV31 és DEV30 közötti fázisban volt a legnagyobb mértékben mérhető a fénycső egyedfejlődést lassító hatása. Az 1. és 2. csoportnál a késleltetés kisebb mértékben tovább nőtt az ezt követő fázisokban is, a maximum a végső növénymagasság fázisánál jelentkezett. A 3. csoportnál a DEV30-as fázisnál tetőzött a késleltetés és onnantól ennek értéke nem változott tovább. Az 5. csoportnál szintén a DEV30 fázisban tetőzött a fénycső késleltető hatása, de az ezt követő későbbi fejlődési fázisokban ez az arány szignifikánsan csökkent.

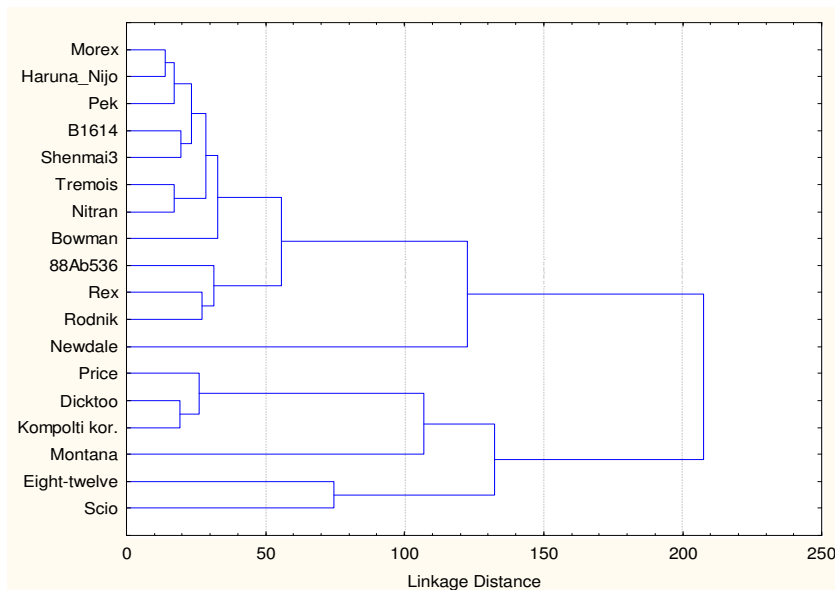
A fényforrásra összegyűjtött adatmátrix teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatát tervezzük a későbbiekben a genetikai komponensek meghatározása érdekében.

4.4 Egyedfejlődés üteme szántóföldön a vetésidő függvényében

A teljes fajtagyűjteményből kiválasztottunk 18 árpafajtát ismert allél összetétellel a VRN és PPD génekben, amiket részletes kísérletbe vontunk annak nyomán követésére, hogy hogyan függ össze a főbb egyedfejlődési gének aktivitásainak változása az egyedfejlődés ütemével természetes szántóföldi körülmények között. A VRN-H1/VRN-H2 gének allél összetétele alapján a fajták közül 7 tavaszi, 5 fakultatív és 6 őszi életformájú. Négy ültetési időt (egy leveles csíranövényeket kiültetve a szántóföldre) alkalmaztunk, három őszi (2009. 10. 05., 2009. 10. 27., 2009. 11. 17.) és egy tavaszi időpontban (2010. 03. 17.). Az őszi ültetések között 3 hét eltérés volt. Emellett az első őszi ültetés időpontjában hasonló volt a nappalhossz, mint a tavaszi ültetés időpontjában (11 óra 27 perc), de míg az őszinél a nappalhossz és a hőmérséklet csökkenő tendenciájú volt, a tavaszinál mindkettő növekedett. A fajtákból 3 hetes időközökben növénymintákat szedtünk mindegyik ültetési időben és meghatároztuk a növények morfológiáját, a tenyészőcsúcs szerkezetét, valamint RNS izolálást követően elemeztük a VRN-H1, VRN-H2, VRN-H3 és a PPD-H1, PPD-H2 gének aktivitását. Ennek alapján minden egyes fajtára meghatároztuk a vegetatív generatív átmenet, (kettős gyűrű az apexen), a kalászka primordiumok megjelenésének, az első szárcsomó, az intenzív szárnövekedés kezdetének, kalászolás és az intenzív szárnövekedés végének időpontjait. Fajtánként több növényt teljes érésig felneveltünk és aratást követően mértük a terméskomponenseket is. Mindezeket az adat mátrixokat kiegészítjük a meteorológiai adatokkal, elsősorban a hőmérséklet, a napi hőösszegek értékeivel. A kísérlet eredményeinek feldolgozása jelenleg is tart, a jelentésben csak részleges adatokat tudunk közölni.

A három őszi ültetési időben mért fenológiai folyamatok adatmátrixa alapján a vizsgált fajták a 14. ábra szerint csoportosultak.

14. ábra: Árpafajták klaszter analízise a három őszi ültetési időben mért fenológiai folyamatok alapján

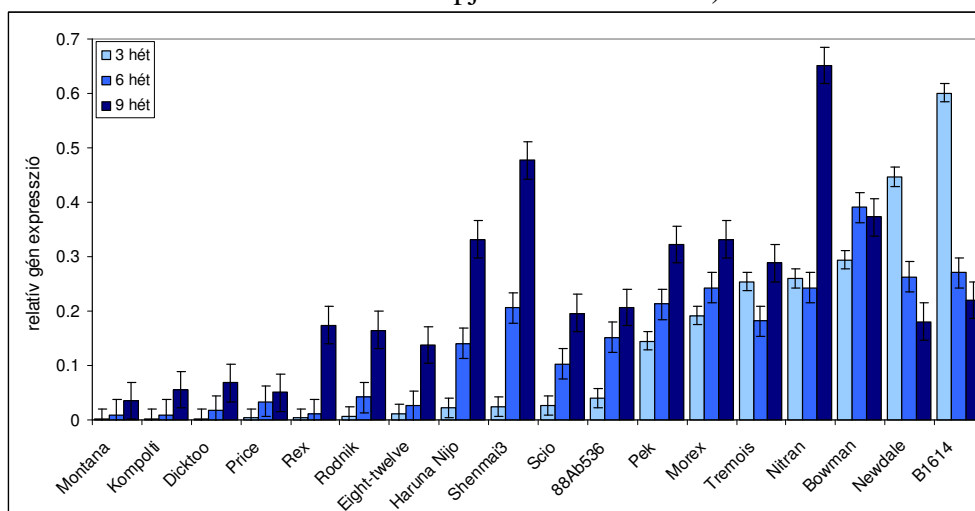


A tavaszi árpafajták fenológiai menete nagy hasonlóságot mutatott egymáshoz. Ezek a fajták az első és a második ültetési időben gyorsan átestek a vegetatív generatív fejlődési átmeneten, sőt még a tél beállta előtt, vagy annak során, a kalászka primordiumok is

kialakultak. Ebbe a csoportba sorolódott két fakultatív fajta is (Haruna nijo és Shenmai3). Ide kapcsolódott a Rex, Rodnik őszi árpa és 88Ab536 fakultatív árpa csoportja is, amelyek az első ültetési időben a tavasziakhoz hasonlóan gyors fejlődésűek voltak, míg a 2. és 3. ültetési időben fejlődésük üteme közelebb állt az ősziékéhez. A többi őszi és fakultatív árpafajták ültetési idő függő fejlődése között nagyobb variabilitás volt tapasztalható. A fajták átlagában az ültetési idők közti különbség a korai fejlődési stádiumokban volt a legnagyobb (vegetatív – generatív átmenet, kalászka primordium megjelenése) és a későbbi stádiumokban jelentősen csökkent, sőt el is tűnt; a kalászolás szinte napra egyformán zajlott a három, őszi ültetésű anyagokban.

A génaktivitások közül a VRN-H1 gén aktivitásának változását szemlélteti a 15. ábra az első ültetési idő kísérletben (2009. 10. 05.). Az ültetést követő harmadik héten mért VRN-H1 aktivitási szintek alapján szinte teljesen elkülönültek az árpafajták az életformájuknak megfelelően. A tavasziak VRN-H1 aktivitása nagy egyedi szórással ugyan, de magas volt, a fakultatív fajtáké alacsony volt, de szignifikánsan meghaladta a 0 szintet, míg az ősziéké nem tért el szignifikánsan a 0-tól, azaz a VRN-H1 gén még nem aktivizálódott bennük. A 6. és különösen a 9. héten mért aktivitási szintekben azonban már jelentősebb variabilitás volt kimutatható, amely kevésbé függött az életformától. A VRN-H1 aktivitása a tavasziak közül a Pek, Morex és Nitran fajtákban fokozatosan növekedett az idő előre haladtával, a Tremois és Bowman fajtáknál stagnáló tendenciát mutatott, míg a Newdale és B1614 fajtákra jelentős szignifikáns csökkenés volt a jellemző. A fakultatív fajtákban a Dicktoo kivételével jelentősen fokozódott a VRN-H1 aktivitása, ugyanígy az ősziék közül 3 fajtában is (Rex, Rodnik, Eight-twelve). A többi őszi fajta aktivitása növekedett ugyan, de alacsony szinten maradt. Az alacsony aktivitású fajtáknál a 9. hétre történt meg a vegetatív generatív átmenet (a Montana kivételével), míg a nagy aktivitást mutató fajtáknál a 6. héten már a kalászka primordiumok szerveződése volt folyamatban.

15. ábra: VRN-H1 gén expressziós szintjének változása a 18 árpafajtában az első ültetési idő kísérletben (2009. 10. 05.), az ültetést követő 3., 6. és 9. héten (aktin normalizált és a 3. hét aktivitásai alapján sorba rendezett)



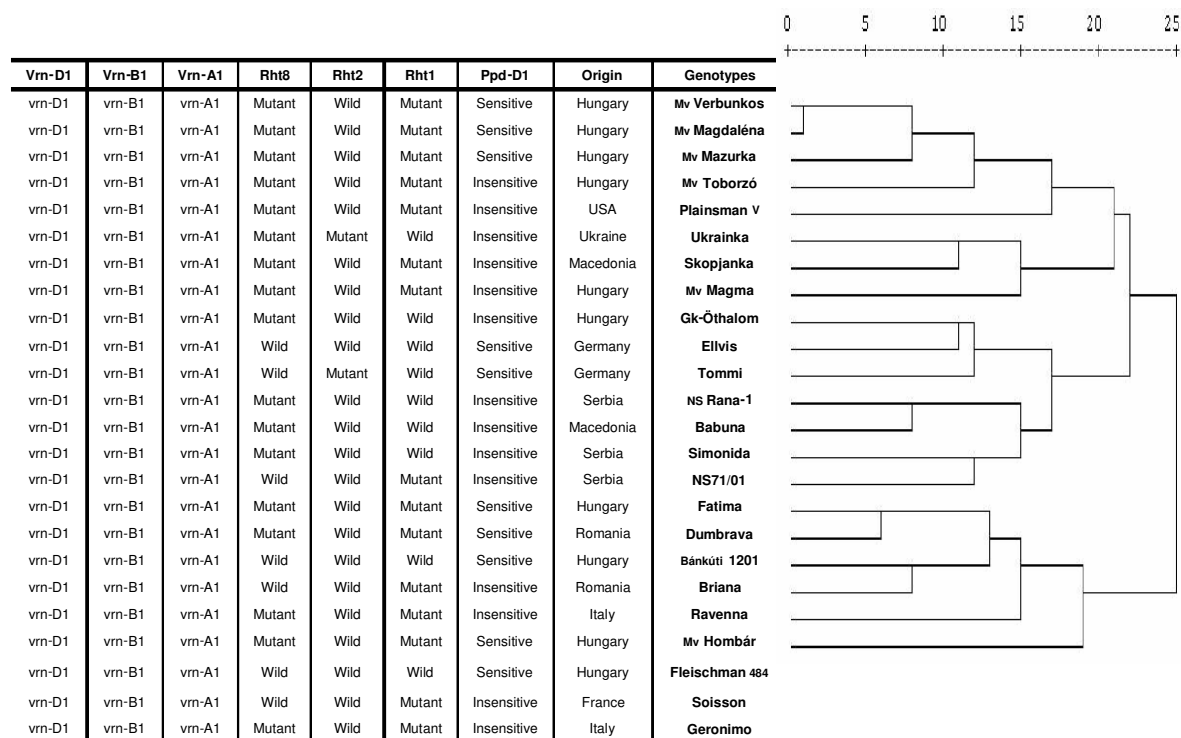
A VRN-H1 gén aktivitásának növekedése és a tenyészőcsúcs szerkezetében bekövetkező minőségi változás nem nyilvánult meg a növények külső morfológiájában; a levélszámban, a hajtás magasságában, valamint a bokrosodás mértékében csak kisebb, inkább fajtához, mint életformához köthető különbségek mutatkoztak. A kalászos gabonaféléknél a virágzás szabályozásának csak az első lépcsőfokát jelenti a tenyészőcsúcs vegetatív-generatív átmenete és a kalászka kezdemények (primordiumok) kialakulása, a következő stádium a szárba indulás

fázisa, amely szántóföldi körülmények között akár 3 - 4 hónappal később következhet be, mint a vegetatív – generatív átmenet. Az első szárcsomó megjelenésének, valamint az első szártag (internódium) megnyúlásának (szárba indulás) idejére befejeződik a kalászka differenciálódás is. Kontrollált klímakamrás kísérletekben, hosszú nappalon ezek a folyamatok gyorsan követik egymást, a tavaszi életformájú árpafajták átlagosan az ültetést követő 17 – 20. napon már a szárba indulás fázisánál tartanak, de az őszi életformájú fajták esetében is az átlag érték 37 – 40 nap közötti. A vegetatív – generatív átmenet, és a szárba indulás kettős lépcsője biztosíthatja, hogy még az olyannyira kedvező őszi időjárási viszonyok ellenére se kezdődjön el idő előtt a kalászolás, és az esetlegesen már kifejlődött generatív szervek az egymásra koncentrikusan boruló levélhüvelyeken belül a szártő mélyén védett helyzetben átvészelhessék a téli fagyokat.

5. Búzafajtákkal végzett vizsgálatok

Hosszú távú célkitűzésünk az árpában összegyűjtött információk felhasználása a búza egyedfejlődésének tanulmányozásában. Az egyedfejlődési vizsgálatokra alapozva célunk a búza ökológiai adaptációjának és termésképzésének tanulmányozása. Mindezek érdekében 24 különböző eredetű búzafajtát vontunk az árpák mellé a kísérletekbe, vizsgálva e fajták reakcióját a különböző környezeti hőmérséklet szintekre, a napi fluktuációt mutató környezeti tényezőkre, és a fényspektrumra egyaránt. Ezeknek az adatmátrixoknak a kiértékelése folyamatban van. A búzafajtára vonatkozó főbb információkat foglalja össze a 16. ábra. Ezek a fajták különböző kétszülős térképezési populáció szülői vonalai, így ha két szülő között eltérő reakciótípust azonosítunk az eltérés mögött meghúzódó genetikai tényezők közvetlenül vizsgálhatóvá válnak a populációikban.

16. ábra: A kontrollált klímakamrás kísérletekbe vont őszi búzafajták származására, genetikai diverzitására vonatkozó információk



Emellett megkezdjük az intézetünk több, mint 650 tételből álló búzafajta gyűjteményének tesztelését a főbb egyedfejlődési gének funkcionális allél típusára.

Ezen eredmények előzetesen a következő publikációkban lettek bemutatva:

- Karsai, I. Veisz O (2009): A koraiság genetikai hátterének vizsgálata búzában (*Triticum aestivum* L.). Hagyomány és haladás a növénynevelésben, XV. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2009. március 17. p 223-227.
- Karsai I, Mészáros K, Kószegi B, Hayes, PM, Bedő Z, Veisz O (2009) A gabonafélék egyedfejlődését és kalászolását meghatározó genetikai komponensek tanulmányozása. In: (Veisz O, szerk) A martonvásári agrárkutatók hatodik évtizede 1999-2009. Martonvásár, 2009, pp37-42. (ISBN: 978-963-8351-35-7)
- Kiss T, Balla K, Veisz O, Láng L, Bedő Z, Karsai I (2012) Allele frequencies in the VRN-B1 and VRN-D1 (vernalization response) and PPD-D1 (Photoperiod sensitivity) genes, and their interactive effects on flowering in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. In: Bedő Z, Láng L (szerk.) Plant Breeding for Future Generations: Proceedings of the 19th EUCARPIA General Congress. Budapest, 2012.05.21-2012.05.24. p. 311.(ISBN:978-963-8351-39-5)

6. A pályázati munkára épülő továbblépés, egyéb eredmények

A pályázat eredményeképpen meghatároztuk a termesztett árpára jellemző természetes variabilitás mértékét a környezeti hőmérsékletre nyújtott reakciókban, azonosítottuk a főbb reakciótípusokat és a sok fajtás gyűjteményben meghatároztuk a főbb genetikai komponenseket is. A genetikai komponensek további vizsgálata céljából kétszülős árpa populációk létrehozásába kezdtünk. Olyan fajtákat választottunk ki keresztezési partnereknek, amelyek eltérő hőmérsékleti reakciótípust képviselnek viszonylag nagy genetikai diverzitással, de a főbb egyedfejlődési génekben megegyező allélokot hordoznak. A tavasziakra és az ősziakra is egyaránt 3 – 3 új keresztezést hoztunk így létre, amelyből a genetikai populációk előállítása megkezdődött.

A pályázati munkának köszönhetően bővültek a nemzetközi kapcsolataink, a szoros spanyol együttműködés mellett, egy olasz (CRA Genomic Research Centre, Fiorenzuola d'Arda) és egy német kutatócsoporttal (IPK, Gatersleben) kezdtünk közös árpakísérletekbe.

Az árpában végzett kísérleteinknek és az összegyűjtött tapasztalatoknak köszönhetően beválasztottak minket egy EU-FP7 konzorciumba, amelynek fő célkitűzése a globális klímaváltozás negatív hatásaként jelentkező termésveszteségek kiküszöbölésére való felkészülés a búza egyedfejlődési fázisaiban és kalászolási idejében mutatkozó variabilitás genetikai és fiziológiai alapjainak minél részletesebb feltárása révén (ADAPTAWHEAT, 2012 – 2015).