SZENT ISTVÁN EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR

ÁRPA SZÁRAZSÁGTŰRÉSÉT BEFOLYÁSOLÓ LÓKUSZOK AZONOSÍTÁSA ÉS MARKER ALAPÚ SZELEKCIÓRA VALÓ ALKALMASSÁGUK VIZSGÁLATA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szira Fruzsina

Gödöllő
2010

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

vezetője: Dr. Heszky László
Egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet

Témavezetők: Dr. Galiba Gábor
Tudományos osztályvezető, egyetemi tanár, az MTA doktora
Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézet,
Növényi Molekuláris Biológia Osztály

Dr. Bálint András Ferenc
Csoportvezető, Ph. D.
Magyar Tudományos Akadémia Mezőgazdasági Kutatóintézet,
Növényi Molekuláris Biológia Osztály,
Kvantitatív Genetikai és Géntérképezési csoport

…… …….. ……

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ... 6
1. BEVEZETÉS ... 9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ... 13
2.1. A szárazságstressz fogalma ... 13
2.2. Szárazságtűrési stratégiák ... 13
2.2.1 Az ozmoreguláció és a sejtfal szerepe a dehidratáció elkerülésében ... 15
2.2.2. A dehidratáció káros hatásainak csökkentése ... 16
2.3. A vízhiány indukálta génexpressziós változások szabályozása ... 18
2.3.1. Az abszcizinsav (ABA) ... 18
2.3.2. A vízhiányhoz kapcsolt jelátviteli utak ... 18
2.4. A szárazságtűrés genetikai hátterének vizsgálata ... 19
2.4.1. A szárazságtűrés, mint kvantitatív jelleg ... 19
2.4.2. A genetikai térkép és a molekuláris markerek ... 20
2.4.3. Térképezési populációk ... 22
2.4.4. QTL analízis ... 23
2.4.5. QTL szignifikancia küszöbérték meghatározására alkalmas módszerek ... 24
2.4.6. QTL analízis szerepe az abiotikus stressztűrés vizsgálatában ... 25
2.4.7. Heritabilitás ... 26
2.5. Szárazságstressz modellezésére használt kísérleti megközelítések ... 27
2.6. Az árpa, mint modellnövény ... 27
2.6.1. Az árpa szárazságtűrésének genetikai kontrollja ... 28
2.6.2. Az árpa fizikai térképezése ... 30
2.7. Marker alapú szelekció ... 30
3. ANYAG ÉS MÓDSZER ... 33
3.1. Kísérletbe vont növényi anyagok ... 33
3.1.1. Szárazságtűrés térképezésére alkalmas populáció kiválasztása ... 33
3.1.2. Az Oregon Wolfe Barley populáció ... 33
3.1.3. Az árpa gyűjtemény ... 34
3.2. A térképezési populáció kiválasztása ... 35
3.2.1. Csíranövényteszt ... 35
3.2.2. Fiatalnövény-teszt ... 35
3.2.3. Az OWB populáció szülői vonalainak felnőttkori tesztje ... 36
3.3. Az OWB populáció tesztje ... 37
3.3.1 Az OWB populáció csíranövény tesztje (*1. kísérlet*) ... 37

3.3.2. Az OWB populáció fiatalnövény-kori tesztjei (*2.* és *3. kísérlet*) 37
3.3.3. Az OWB populáció felnőtt-kori tesztjei 38
3.3.3.1. Fóliasátras teszt (*4. kísérlet*) 38
3.3.3.2. Üvegházi teszt (*5. kísérlet*) 39
3.3.3.3. Fitotron teszt (*6. kísérlet*)..... 40
3.3.3.4. Kontrollált vízellátású szántóföldi tesztrendszer (*7. kísérlet*)..... 40
3.3.3.5. Szántóföldi szárazságstresz (*8. kísérlet*) 41
3.3.3.6. Kémiai deszikkáció szántóföldön (*9. kísérlet*)..... 42
3.4. Az árpa gyűjtemény tesztje 42
3.5. EST homológia keresés 43
3.6. Marker analízis 43
3.7. Statisztikai analízis 43
4. EREDMÉNYEK..... 45
4.1. A térképezési populáció kiválasztása 45
4.1.1. Szülői vonalak csíranövény tesztje..... 45
4.1.2. Szülői vonalak fiatalnövény-kori tesztje..... 46
4.1.3. Az OWB populáció szülői vonalainak felnőttkori vizsgálata 48
4.2. Csíranövény tesztek az OWB populáción..... 49
4.2.1. Az OWB populáció csíranövénykori fenotípusos jellemzői..... 49
4.2.2. Az OWB populáción csíranövénykorban azonosított lókuszok..... 50
4.3. Fiatalnövény-kori tesztek az OWB populáción..... 50
4.3.1. Az OWB populáció fiatalnövény-kori fenotípusos jellemzői..... 50
4.3.2. Az OWB populáción fiatalnövény korban azonosított lókuszok 52
4.4. Felnőtt kori tesztek az OWB populáción..... 52
4.4.1. Az OWB populáció felnőttkori fenotípusos jellemzői 52
4.4.2. Az OWB populáción felnőtt korban azonosított lókuszok 56
4.5. Teljes életciklus során szerepet játszó hajtáshosszt befolyásoló QTL-ek az OWB populáción 57
4.6. Az OWB populáción több fejlődési fázisban azonosított átfedő régiók 58
4.7. Az EST szekvenciák funkcionális fehérjékkel mutatott homológiája 59
4.8. Az árpagyűjtemény tesztelése 62
4.8.1. Az árpagyűjtemény fenotípusos adatai..... 62
4.8.2. Kiválasztott markerek tesztelése az árpagyűjteményen..... 62
4.9. Az eredmények megvitatása..... 65
4.9.1. Az OWB populáció vizsgálata során alkalmazott kísérleti beállítások értékelése..... 65

4.9.2. A szegregáló morfológiai- és a vizsgált fenotípusos jellegek szerepe az OWB populáció szárazságtűrésében ... 66
4.9.3. Az OWB populáción azonosított QTL-ek összehasonlítása ismert lókuszokkal ... 67
4.9.4. Az azonosított QTL-ek feltételezett funkciója EST szekvenciák alapján ... 69
4.9.5. Marker alapú szelekcióra felhasználható markerek ... 71
4.10. Új tudományos eredmények ... 73
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK ... 75
6. ÖSSZEFOGLALÁS ... 77
7. SUMMARY ... 80
MELLÉKLETEK ... 81
M1. Irodalomjegyzék ... 81
M2. Genomi DNS izolálásának módszere a mikroszatellit analízishez ... 91
M3. Mikroszatellit analízis PCR reakcióinak körülményei ... 91
M4. A *GBM1359, GBM1404* és a *GBM1498* markerek árpagyűjteményben azonosított alléltípusai. ... 92
M5. A kontrollált vízellátású és a természetes csapadékellátottságú szántóföldi tesztrendszer területére vonatkozó talajnedvesség adatok ... 93
M6. Az OWB populáció kapcsoltsági térképe ... 94
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 96

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AB: advanced backcross

ABA: abszcizinsav

ABRE: ABA responsive element

AFLP: amplified fragment length polymorphism

AREB: ABRE-binding protein

BAC: bacterial artificial chromosome

BC: backcross

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bp: bázis pár

CIM: composite interval mapping

cM: centimorgan

DArT: diversity array technology

DH: dihaploid

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

DRE/CRT: dehydration-responsive element/C-repeat

DREB: DRE-binding element

DW: dry weight

EDTA: Ethylene-diamine-tetra-acetic-acid

ERD1: early-responsive to dehydratation 1

EST: expressed sequence tag

FW: fresh weight

GBM: gatersleben barley microsatellite

H^2, h^2 : örökíthetőség

HD-ZIP: homeodomain-leucine-zipper

HIR: hypersensitive-induced reaction protein

ICARDA: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas

IM: interval mapping

IPK: Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research

LD: linkage disequilibrium

LEA: late embryogenesis abundant

LMM: linear mixed model

LOD: logarithm of odds

LR: likelihood ratio

M: mol/dm^3

MAS: marker assisted selection

MCIM: mixed-model-based composite interval mapping

MIM: multiple interval mapping

MQM mapping: multiple QTL model-mapping

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NEPP: number of ear per plant

NGPE: number of grain per ear

OA: ozmotikus adaptáció

OP: ozmotikus potenciál

OP_{100}: teljes turgoron mért ozmotikus potenciál

OWB: Oregon Wolfe Barley

PCR: polymerase chain reaction

PEG: poli-etilén-glikol

QTL: quantitave trait locus

RFLP: restriction fragment length polymorphism

RH: relative humidity

RIL: recombinant inbred line

RL: root lenght

ROS: reactive oxygen species

RWC: relative water content

SIM: simple interval mapping

SL: shoot length

SMA: single marker ANOVA

SMR: single marker regression

SNP: single nucleotide polymorphism

SSR: simple sequence repeat

SW: saturated weight

TGW: thousand grain weight

TI: tolerancia index

V_A: additív komponensek átlagos varianciája

V_D: dominanciából eredő variancia

V_E: környezeti eredetű variancia

V_e: reziduális variancia

$V_{E\times G}$: környezeti és genetikai faktorok kölcsönhatásából eredő variancia

V_G: genetikai eredetű variancia

V_I: episztázisból eredő variancia

V_P: teljes fenotípusos variancia

VSMC: volumetric soil moisture content

Y/P: yield per plant

Y/S: yield per spike

ε: elasztikus modulus

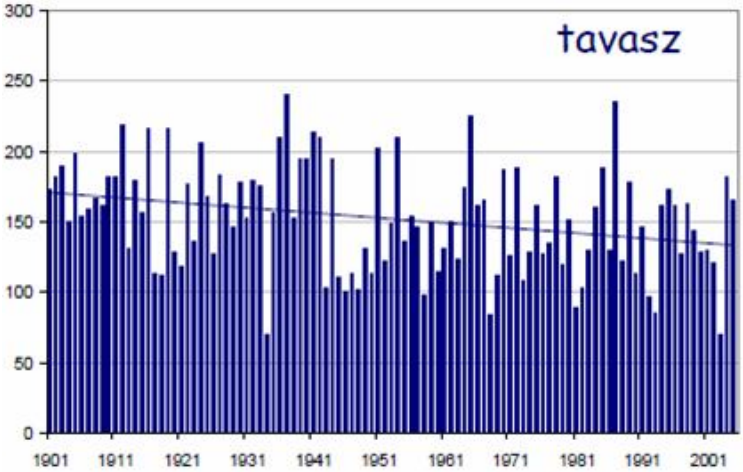
ψ_p: turgor potenciál (MPa)

ψ_s: ozmotikus potenciál (MPa)

ψ_w: növényi sejtek vízpotenciálja (MPa)

1. BEVEZETÉS

A szárazság és a vízhiány világszerte az egyik legfontosabb terméscsökkentő tényező. Magyarország, mint mérsékelt éghajlati övezetbe tartozó kontinentális éghajlatú terület, nem tartozik a szélsőségesen száraz területek közé, azonban a csapadék mennyisége az egyes években jelentősen eltérhet. 2003-ban 476 mm, míg az azt követő évben 686 mm volt az évi csapadék mennyisége, amely az őszi búza termésátlagában is jelentős különbséget okozott (Cseuz 2009). A változó csapadékmennyiségen kívül a csapadék éves eloszlása sem egyenletes. Gyakran tapasztalható nyáron, a gabonafélék fő vegetációs periódusában csapadékhiány, illetve magas hőmérséklettel párosulva aszály. Mindezek mellett az elmúlt 100 évben a tavasszal hullott csapadék mennyisége is jelentős csökkenést mutatott (**1. ábra**).



1. ábra

Tavasszal hullott csapadék mennyisége a 20. században

(Országos Meteorológiai Szolgálat)

A fentiekből következik, hogy hazai viszonyok mellett olyan mezőgazdasági növények nemesítése a cél, amelyek bármelyik életszakaszban jól tűrik a csapadékhiányt és termésük a lehető legkisebb mértékben csökken szárazságstressz hatására (Lelley 1963). A szárazságtűrés hazánkban a gabonafélék termésbiztonságának meghatározó eleme, de ellentétben a sivatagos országokkal nálunk a termés mennyiségének megtartása, és nem a növények túlélésének biztosítása az elsődleges cél.

A széles genetikai bázissal rendelkező gabonafélék rokonságába tartozó vad fajok fontos génforrást jelentenek a nemesítők számára. Az új, környezeti tényezőkkel szemben toleránsabb fajták előállításához szintén fontos kiindulási vagy keresztezési alapanyagot biztosítanak a különböző génbankokban tárolt tájfajták, vagy termesztésből már kivont fajták. A rendelkezésre álló alapanyagok aktuális célnak megfelelő szelektálását jelentősen lerövidítheti és nagyban segítheti a marker alapú szelekció (MAS – ***m**arker **a**ssisted **s**election*): a genotípusok hosszas

tesztelése helyett elég csak egy, illetve néhány, a szelektálni kívánt jelleggel kapcsolt markert megvizsgálni, mely alapján megjósolható, hogy az adott genotípus a kívánt jelleget hordozza-e, vagy sem. A MAS alkalmazásának azonban feltétele a megfelelő genetikai markerek azonosítása. Egyes agronómiai szempontból fontos fenotípusos jellegek, vagy biotikus rezisztencia esetében a MAS bizonyítottan hatékony. Komplex jellegek esetében - ilyen a szárazságtűrés is - a kapcsolt markerek hiánya, korlátozott száma vagy a kis fenotípusos hatás miatt a marker alapú szelekciót a nemesítők még nem alkalmazzák.

A szárazságtűrés mennyiségi, azaz kvantitatív jelleg, amelynek kialakításában számos gén játszik szerepet, és a jelleg megnyilvánulását a környezet is nagyban befolyásolja (Ceccarelli 1987). Az alap és alkalmazott kutatás területén elért számos eredmény ellenére a jelleg genetikai és élettani háttere részleteiben egyelőre még kevéssé ismert. A szárazságtűrést meghatározó gének és azok funkciójának bizonyítása így a modern genetika egyik nagy kihívása (Luo *et al*. 2002, Galiba 2002).

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) amellett, hogy fontos termesztett növényünk, a gabonafélék ideális genetikai modellnövénye. A *Triticeae* tribuszba tartozó fajok egyes kromoszómái között meglévő homeológia miatt (Feuillet és Keller 2002) az árpán elért eredmények más, közeli rokon fajok (pl. búza) esetében is használhatóak. Az árpa további előnye, hogy a búzánál jóval kisebb genommal rendelkezik, diploid faj, és eredete miatt általánosságban jó szárazságtűréssel is rendelkezik.

Mindezek alapján munkánk elsődleges célja az árpa szárazságtűrését befolyásoló lókuszok azonosítása, és az azonosított lókuszok szerepének vizsgálata volt. Mivel a vízhiány és a szárazság a növény bármely egyedfejlődési fázisában bekövetkezhet, több fejlődési fázisban is szükséges a toleranciáért felelős lókuszok meghatározása. Ezáltal válik lehetővé az általános és az egyedfejődés specifikus QTL-ek (***q****uantitative* ***t****rait* ***l****oci* - mennyiségi jelleget meghatározó lókuszok) elkülönítése. Ezekhez a lókuszokhoz kapcsolt markerek alkalmasak lehetnek a szárazságtűrés marker alapú szelekciójára. Ezen eredmények elérése érdekében a következő feladatok elvégzését tűztük ki célul:

1. Szárazságtűrés vizsgálatára alkalmas térképezési populáció kiválasztása különböző árpa térképezési populációk szülői vonalaival végzett előkísérletek alapján.
2. A kiválasztott populáció vonalainak tesztelése több egyedfejlődési fázisban csíra- és fiatalnövény korban, valamint érésig nevelt növényekkel.
3. Különböző ozmotikus stressz- és szárazságtűrési tesztelési rendszerek párhuzamos alkalmazása és összevetése. Hangsúlyt fektetve a nagy számú genotípus tesztelésére alkalmas egyszerű és gyors, valamint a nehezebben kivitelezhető, de természetszerű tesztelési rendszerekre egyaránt.
4. Szárazságtűrést befolyásoló lókuszok azonosítása különböző egyedfejlődési fázisokban.

5. Az általunk azonosított QTL-ek szétválasztása egyedfejlődési fázis specifikus és általános hatású lókuszokra.
6. A QTL-ekhez kapcsolt EST (***e****xpressed* ***s****equence* ***t****ag* – expresszált szekvencia szakasz) markerek szekvenciájának összevetése szekvencia adatbázisokkal és ezáltal az azonosított QTL régiókhoz tartozó jelölt gének kiválasztása.
7. Az OWB populáción azonosított szárazságtűrést befolyásoló lókuszokhoz kapcsolt markerek marker alapú szelekcióra való felhasználhatóságának vizsgálata egy eltérő származású genotípusokat tartalmazó fajtagyűjteményen.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szárazságstressz fogalma

A szárazság definiálható egy olyan perióduskénti, amely során az átlagosnál kevesebb csapadék hullik és ennek következtében a növények termőképessége természetes vagy mezőgazdasági körülmények között csökken (Boyer 1982). Egy másik, szűkebb értelemben vett megfogalmazás szerint akkor beszélhetünk vízhiányról, amikor a növény transzspirációja meghaladja vízfelvételét (Bray 1997). Szántóföldön a szárazsághoz gyakran egyéb stressz (hőstressz, sóstressz) is társulhat, illetve maga a vízhiány is kiválthatja ezeket (pl.: tápanyaghiány vagy felesleg a szállítófolyamatok károsodása miatt). Ebben a stressz komponens, amivel a szárazság legpontosabban definiálható, az a talajban található víz elérhetőségének, azaz a vízpotenciálnak (ψ_w) a csökkenése (Verslues *et al.* 2006).

Annak ellenére, hogy a sejten belüli vízhiány számos abiotikus stressz (sóstressz, fagy) során fellép, legegyértelműbb hatása a szárazságstressz során érvényesül. Mivel a szárazság időtartama, erőssége és megjelenésének ideje nagy változékonyságot mutathat, ezért kontrollált körülmények között nehezen modellezhető. Vizsgálata leghatékonyabban szántóföldön a célkörnyezet - és ez által a szárazságstressz típusának - meghatározásával történhet (Tuberosa és Salvi 2006).

2.2. Szárazságtűrési stratégiák

A szárazságtűrés egy rendkívül összetett jelleg, amelynek kialakításában morfológiai, biokémiai és molekuláris adaptációs mechanizmusok, sejt- és szervezet szintű válaszreakciók egyaránt részt vesznek (Passioura 1996). Ezek a folyamatok együttesen járulnak hozzá ahhoz, hogy a növény elkerülje, vagy túlélje a vízhiányt. Mivel Magyarország nem tartozik a szélsőségesen száraz területek közé, így alapvetően azt a növényt nevezzük szárazságtűrőnek, amely az aszályos években is viszonylag nagy termést ad és vízhiány hatására termése a lehető legkisebb mértékben csökken (Cseuz 2009).

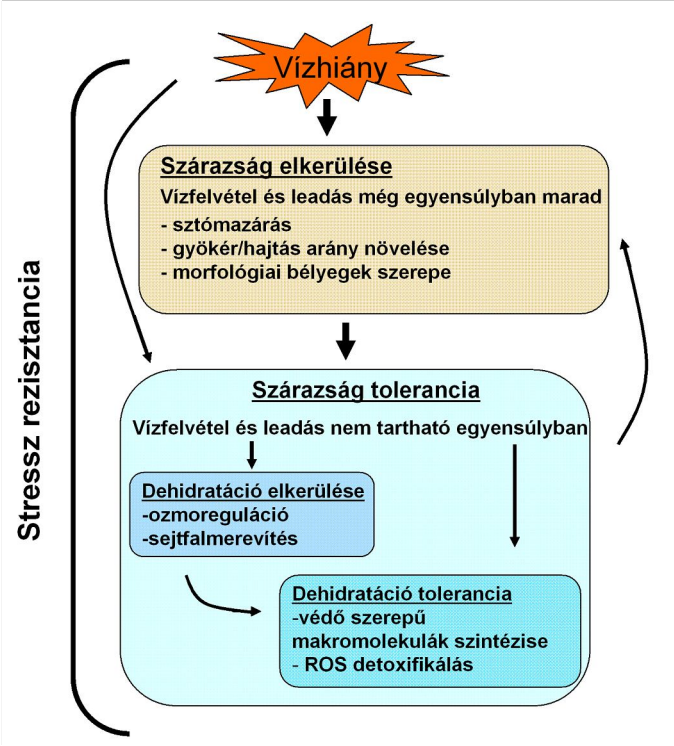
A vízhiány káros hatásainak kivédésére a növények különböző stratégiákat alkalmaznak. Levitt (1980) klasszikus terminológiája alapján a szárazsághoz való adaptáción belül elkülönítünk rezisztenciát (*drought resistance*) és menekülést (*drought escape*). A rezisztencia tovább osztható a szárazság elkerülését (*drought avoidance*) és a szárazság tolerálását (*drought tolerance*) biztosító folyamatokra. A tolerancián belül megkülönböztetjük a dehidratáció elkerülését (*dehydratation avoidance*) és a dehidratáció tolerálását (*dehydratation tolerance*) biztosító folyamatokat. Ez a klasszikus felosztás jó alapot biztosít a különböző hatások rendszerezéséhez, de azóta nyilvánvalóvá vált, hogy egyes folyamatok (pl.: prolin felhalmozódás) nem illeszthetőek be kizárólagosan a

kategóriák valamelyikébe (Verslues *et al.* 2006), illetve a rezisztencia fogalmának használatát elsősorban biotikus tényezők esetében tartjuk helyesnek. Az egyes stratégiák tehát egy növényen belül keveredhetnek és a gyakorlatban egymással kölcsönhatva alakítják ki a végső válaszreakciót.

A menekülési stratégiát (*drought escape*) alkalmazó növények elsősorban életciklusuk rövidítésével és gyors reproduktív fázisukkal igyekeznek minimálisra csökkenteni a szárazság negatív hatását. Ehhez kapcsolódó adaptív jellegnek tekintjük a koraiságot és a gyors szemtelítődést.

A szárazság elkerülése (*drought avoidance*) alapvetően enyhébb szárazság esetén nyújt megfelelő védelmet (Kramer és Boyer 1995). Általánosságban a vízhiány érzékelését követő első válaszreakció a további vízvesztés megakadályozása (vízvesztés elkerülése). A stressz kezdeti szakaszában a szövetek vízpotenciálja és víztartalma még a normálishoz közeli. A vízfelvétel és leadás egyensúlyban maradhat, amely rövid távon a sztómák zárásával, hosszabb távon pedig a megnövekedett hajtás-gyökér aránnyal biztosítható. A vízvesztés megakadályozásában fontos szerepe lehet az olyan morfológiai bélyegeknek is, mint a levelek viaszoltsága, szőrözöttsége és állása, vagy a gázcserenyílások helyzete.

Ha a vízhiány fokozódik és a növény nem képes tovább fenntartani a vízleadás és felvétel közötti egyensúlyt a növényi funkciók épségét a szárazság tolerancia (*drought tolerance*) stratégiába sorolt folyamatok biztosíthatják. Ide soroljuk az ozmoregulációt, valamint a sejtfalhoz kötött változásokat (*dehydratation avoidance*). Tartósan fennálló, fokozódó vízhiány esetén egyre nehezebbé válik a dehidratáció elkerülése és az alacsony víztartalom tolerálásában szerepet játszó mechanizmusok válnak fontossá (*dehydratation tolerance*). Ide sorolhatjuk a makromolekulák integritásának védelmét biztosító fehérjék vagy egyéb vízoldható vegyületek, és a reaktív oxigénszármazékokat (ROS – ***r**eactive **o**xygen **s**pecies*) semlegesítő molekulák fokozott szintézisét is. A szárazság elkerülését és/vagy tolerálását biztosító főbb folyamatokat az **2. ábra** foglalja össze.



2. ábra.

Az elkerülési és a tolerancia stratégiákban szerepet játszó folyamatok Levitt (1980) terminológiája alapján

2.2.1 Az ozmoreguláció és a sejtfal szerepe a dehidratáció elkerülésében

Szárazság, azaz alacsony talaj vízpotenciál esetén a növény csak akkor képes vizet felvenni, ha a szövetek vízpotenciálja negatívabb a talajénál. A növényi sejtek vízpotenciál (ψ_w) értékét a $\psi_w = \psi_s + \psi_p$ (ψ_s, ozmotikus potenciál, ψ_p, turgor potenciál) egyenlettel lehet kifejezni. Az egyenlet alapján a vízfelvételhez szükséges csökkenő ψ_w érték ozmotikusan aktív anyagok szintézisével, azaz ψ_s csökkentésével biztosítható. Azt a folyamatot, amely során a növény vízhiány hatására ozmotikusan aktív anyagokat halmoz fel ozmoregulációnak nevezzük. Az ozmoreguláció a növény számára kedvezőbb vízpotenciál grádiens kialakulását teszi lehetővé, ezáltal hozzájárul a sejt turgorának fenntartásához (Zhang *et al.* 1999). Így a vízhiány bizonyos mértékig elkerülhető vagy jelentős mértékben csökkenthető. Az ozmoreguláció során felhalmozott anyagokat összefoglaló néven kompatibilis vegyületeknek nevezzük, utalva arra, hogy megemelkedett sejten belüli koncentrációjuk ellenére sem befolyásolják a sejtanyagcserét (Yancey *et al.* 1982). Ezek a vegyületek főként alkilaminok vagy polihidroxil vegyületek, leggyakrabban a prolin, glicinbetain és egyéb alacsony molakulasúlyú aminosavak, valamint szacharidok (fruktán, mannitol) és ezek polihidroxil származékai. A stresszfiziológiában általánosan elfogadott szerepük az ozmoreguláció, ettől eltérő vélemény szerint azonban a prolin és glicinbetain szintézis elsősorban a sejten belüli redoxfolyamatok egyensúlyáért felelős (Hare *et al.* 1998). Ezekben az anyagcsereutakban részt vevő gének túlexpresszáltatásával számos transzgénikus növényt állítottak már elő (mannitol:

Tarczynski *et al.* 1993, prolin: Kishor *et al.* 1995, fruktán: Pilonsmits *et al.* 1995, glicinbetain: Huang *et al.* 2000), amelyek laborkísérletekben különböző mértékben befolyásolták az abiotikus stressztoleranciát. A kompatibilis vegyületek az ozmoreguláción kívül a sejtalkotók integritásának megőrzésében is fontos szerepet játszanak (Hincha és Hagemann 2004).

Az első irodalmi adatok alapján az ozmoregulációt búzában a 7A kromoszóma rövid karján található gén (*or*) hatásának tulajdonították (Morgan 1991). Ez a gén rizsben a búza 7-es kromoszómájával homeológ 8-as kromoszómán helyezkedik el (Lilley *et al.* 1996). Későbbi részletesebb vizsgálatok azonban több, az ozmoregulációban és az ezzel összefüggő jellegek kialakításában (ozmotikus potenciál, ozmotikus adaptáció, relatív víztartalom) szerepet játszó lókuszt is azonosítottak, amely adatok a többgénes öröklődésre utaltak. Árpában a 7H kromoszómán talált lókuszon kívül, 12 olyan kromoszómális régiót (32 QTL) találtak, amelyek szerepet játszanak a vízháztartásban és/vagy az ozmotikus adaptációban (Teulat *et al.* 1998, Teulat *et al.* 2002), pontos funkciójuk egyelőre még nem ismert.

A növényi sejtek vízfelvétele bizonyos mértékig a sejtfal elasztikus tulajdonságainak megváltoztatásával, azaz a ψ_p-vel is szabályozható (Verslues *et al.* 2006). A sejtfal rugalmassági képességét az elasztikus modulussal (ε) jellemezhetjük. Azt a nyomásértéket fejezi ki, amely a sejttérfogat egységnyi térfogatváltozásához szükséges (Murphy és Ortega 1995). Ha az ε alacsony, akkor a vízvesztés térfogatvesztéssel jár, de a sejt turgora kisebb mértékben változik. Ez magas ψ_w értéket, és további vízvesztést eredményez. Ezzel szemben a nagyobb ε lehetővé teszi, hogy a vízvesztést a sejtfal rugalmatlansága miatt a sejt turgorának csökkenése kövesse és a további vízvesztés ezáltal elkerülhető.

2.2.2. A dehidratáció káros hatásainak csökkentése

Súlyos vízhiány esetén, amikor a dehidratáció elkerülhetetlen, fontos feladat a sejtalkotók integritásának védelme, a proteinek funkcióvesztésének elkerülése és a keletkező reaktív oxigénformák szintjének szabályozása.

A vízvesztés hatása bizonyos mértékig hasonlít a különböző magvakban és szemtermésekben lejátszódó érési folyamatokhoz. Ilyenkor számos hidrofil globuláris protein akkumulálódik, amely fokozott deszikkációval szembeni toleranciához vezet és biztosítja a csírázáshoz szükséges makromolekulák integritását is. Ezek közül az úgynevezett LEA (***l**ate **e**mbryogenesis **a**bundant*) proteinek akkumulációját azonban vízhiány alatt vegetatív szervekben is megfigyelték. Extrém hidrofil jellegükből adódóan, valamint chaperon és detergens-szerű tulajdonságaik révén fontos szerepük van a protein és membránstruktúrák fenntartásában (Close 1996). A HVA1 például egy abszcizinsav függő LEA 3 típusú fehérje, amelyet elsőként az árpa aleuronrétegéből izoláltak és transzgénikus rizsben túlexpesszáltatva azt tapasztalták, hogy

pozitívan befolyásolta a szárazságtűrést (Xu *et al.* 1996). A dehydrinek szintén a LEA proteinek csoportjába tartozó (*Group 2*) sejten belüli stabilizátorok, amelyek vezikulákhoz és egyéb endomembrán struktúrákhoz kötődhetnek. Indukciójukat szárazság mellett egyéb stresszek során (pl.: hideg, sóstressz) is megfigyelték (Koag *et al.* 2003).

Ahogy a legtöbb abiotikus stressz során, úgy vízhiány esetén is felszaporodnak reaktív oxigénformák, amelyek forrása elsősorban a fotorespiráció és a mitokondriális légzés. Ezek a membránlipidek, enzimek és a nukleinsavak károsodását okozhatják, ezért sejten belüli szintjük szigorú kontroll alatt áll. Az utóbbi években az is nyilvánvalóvá vált, hogy a ROS-ok másodlagos hírvivőként is funkcionálnak, részt vesznek a programozott sejthalál szabályozásában és az abiotikus stresszválaszok közvetítésében is (Kocsy *et al.* 2001, Mittler 2002). Vízhiány esetén megváltozhat a ROS és a semlegesítésükben szerepet játszó antioxidáns enzimek (aszkorbát-peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz, kataláz) egyensúlyi aránya, amely összefüggést mutat a vízhiány által okozott károsodás mértékével is (Zhang *et al.* 1994).

Általánosan ismert, hogy vízhiány hatására a növények poliaminokat is felhalmozhatnak. A poliaminok biológiai funkcióját alapvetően ionos tulajdonságaik határozzák meg. Pozitív töltésük révén képesek kapcsolódni a negatív töltésű fehérjékkel és nukleinsavakkal, ezáltal befolyásolják a membránok stabilitását és permeábilitását, valamint stabilizálják a nukleinsavak másodlagos szerkezetét (Galston és Shawney 1990, Galiba *et al.* 1993). Abiotikus stresszek elleni védekezésben és a tolerancia kialakításában antioxidáns kapacitásuk és a ROS-ok semlegesítésében betöltött szerepük miatt fontosak. Pontos hatásmechanizmusuk azonban még nem tisztázott (Groppa és Benavides 2008). Megfigyelték, hogy a putreszcin szintje ozmotikus stressz hatására az arginin-dekarboxiláz fokozott aktivitása miatt jelentősen emelkedik. A vízhiány elleni védelemben azonban az ebből képződő spermint és spermidint tartják elsősorban fontosnak (Groppa és Benavides 2008).

Az aquaporinok a membránokon keresztüli aktív víztranszportért felelősek és jelentősen hozzájárulnak stressz alatt a vízháztartás egyensúlyának fenntartásához (Assmann és Haubrick 1996). Az aquaporinok mennyiségét és aktivitását számos faktor befolyásolja, ezáltal a növény alacsony vízpotenciál mellet is aktívan képes szabályozni a víz transzportját és a kompartmentalizációt (Tyerman *et al.* 1999). Vízhiány alatt bizonyos aquaporinok transzkripciójának csökkenését figyelték meg, ami a sejtek hidraulikus vezetőképességét is befolyásolta (Mahdieh *et al.* 2008). Más aquaporin gének túlexpresszáltatása azonban jobb szárazságtűrést eredményezett transzgénikus növényekben (Cui *et al.* 2008).

A vízháztartás szabályozásában a K^+ is fontos szerepet játszik, amely K^+ csatornákon keresztül jut át a sejtmembránon. Szerepe van a membrán és a turgorpotenciál fenntartásában, az ozmotikus nyomás és a sztómazáródás szabályozásában. Rizsben kimutatták, hogy egy aquaporin gén és egy K^+ csatornát kódoló gén transzkripciója korrelál egymással poli-etilén-glikol

(ozmotikum) kezelés és K^+ hiány hatására. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az aquaporinok és K^+ csatornák a vízháztartás hasonló folyamataiban játszanak szerepet (Liu *et al.* 2006).

2.3. A vízhiány indukálta génexpressziós változások szabályozása

Az array (micro- és macroarray) alapú technikák alkalmazásával lehetővé vált nagyszámú, stressz indukált transzkripciós faktor célgénjeinek azonosítása, amely utat nyitott az abiotikus stresszválaszok kialakításában szerepet játszó jelátviteli utak vizsgálatához is (Seki *et al.* 2007).

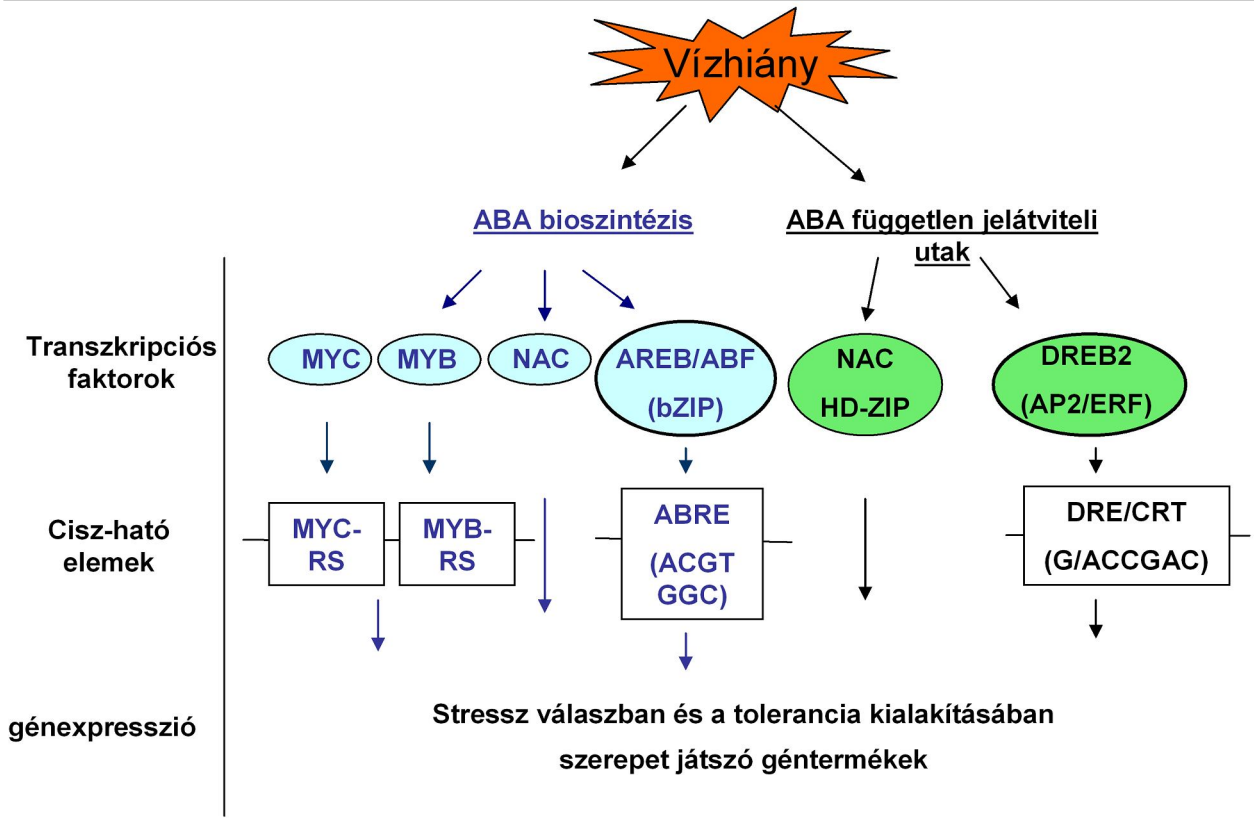
2.3.1. Az abszcizinsav (ABA)

Az abszcizinsav egy jól jellemzett növényi stresszhormon, amely élettani hatásain kívül különböző stresszválaszok jelátviteli mechanizmusaiban is fontos szerepet játszik. Gátolja a növekedést és a sejtosztódást, szabályozza a levelek és termések leválását, valamint a dormanciát. Akkumulációja számos környezeti stressz esetén megfigyelhető (Bray 1997). A növény vaszkuláris rendszerén keresztül szállítódik és vízhiány esetén elsődleges funkciója a gyors sztómazárás és a stressz indukálta génexpressziós változások elindítása (Wasilewska *et al*. 2008). A szárazságstressz indukálható gének vizsgálata során több ABA-függő és ABA-független jelátviteli út elkülönítése vált lehetővé.

2.3.2. A vízhiányhoz kapcsolt jelátviteli utak

A stresszindukálható géneket funkciójuk alapján két csoportra oszthatjuk (Shinozaki *et al.* 2003). Az egyik csoportba tartoznak a tolerancia kialakításáért felelős gének, amelyek termékei chaperonok, LEA proteinek, az ozmotikumok bioszintézisében vagy a detoxifikálásban szerepet játszó fehérjék (funkcionális fehérjék). A másik csoportba a stresszválaszok jelátvitelében és a génexpresszió szabályozásában szerepet játszó gének pl: protein kinázok vagy a foszfolipid metabolizmusban szerepet játszó enzimek génjei és transzkripciós faktorok tartoznak (szabályozó fehérjék).

A stresszindukálható gének promóteranalízise alapján több ABA-függő és ABA-független jelátviteli utat is megkülönböztetünk (Shinozaki *et al.* 2007). A stresszindukálható gének promóterében az úgynevezett cisz-ható elemek azok, amelyekkel a transzkripciós faktorok kölcsönhatnak és ennek következtében befolyásolják az adott gén transzkripcióját. A jelenleg ismert szárazság- vagy ozmotikus stressz indukálható gének szabályozásában szerepet játszó főbb transzkripciós faktorok és cisz-ható elemeik egyszerűsített rendszerét *Arabidopsis*-ban a **3. ábra** szemlélteti. Különböző stressz szignalizációs utak között azonban jelentős átfedések vannak, számos vízhiány hatására indukálódó gén expressziójának változását más abiotikus stresszek során is megfigyelték (Seki *et al.* 2007).



3. ábra

A vízhiány során aktiválódó abszcizinsav (ABA) függő és ABA független jelátviteli utak vázlata Shinozaki *et al.* 2007 alapján

Vízhiány hatására aktiválódó gének elemzése alapján a cisz-ható elemek két nagy csoportját az ABRE-et (*ABA-responsive element*) és a DRE/CRT-ét (*dehydration-responsive element/C-repeat*) különböztethetjük meg. Az AREB-et (*ABRE-binding protein*) tartalmazó AP2, valamint a MYC és MYB transzkripciós faktorok is az ABA függő jelátviteli utakhoz tartoznak. Az *Arabidopsis* RD26 gén által kódolt NAC transzkripciós faktornak szintén szerepe van az ABA függő streszválaszok közvetítésében. A DREB2 (*DRE-binding element 2*) a legjelentősebb vízhiány hatására indukálódó ABA független transzkripciós faktor *Arabidopsis*-ban. Az ERD1 (*early-responsive to dehydration 1*) szárazságindukált gén cisz-ható elemeiként azonosított két új NAC és HD-ZIP (*homeodomain-leucine-zipper*) transzkripciós faktorok szintén az ABA-független válaszreakciókban vesznek részt.

2.4. A szárazságtűrés genetikai hátterének vizsgálata

2.4.1. A szárazságtűrés, mint kvantitatív jelleg

Mind az állatoknál, mind a növényeknél léteznek öröklött jellegek, amelyek fenotípusos formái nem sorolhatók határozottan elkülöníthető, diszkrét kategóriákba (pl.: szemszín), hanem folytonos eloszlást mutatnak (pl.: magasság, termésmennyiség). Ezeket a jellegeket mennyiségi vagy más néven kvantitatív tulajdonságoknak nevezzük szemben a minőségi, azaz kvalitatív tulajdonságokkal. A mennyiségi tulajdonságokra jellemező, hogy több gén által meghatározottak, poligénes öröklődésűek, és kifejeződésüket a környezet nagymértékben befolyásolja. Az egyes gének szerepe additív és eltérő mértékben járul hozzá az adott fenotípus kialakításához. A valódi

mennyiségi jellegekre jellemző, hogy a környezeti eredetű variabilitás elfedi a diszkrét fenotípusos kategóriák közötti különbségeket, ezzel téve folytonossá a fenotípusos eloszlást. Az ilyen jelleg nagy számú egyeden vizsgálva normál eloszlást mutat. Öröklődésük több, de egyenként mendeli öröklődést követő gének együttes hatásával magyarázható.

Azokat a kromoszómaszakaszokat, amelyek szerepet játszanak a kvantitatív tulajdonságok kialakításában mennyiségi jellegeket meghatározó lókuszoknak, röviden QTL-eknek nevezzük. Általában egy, vagy néhány nagy (*major*), és több, változó számú kis (*minor*) QTL vesz rész egy adott jelleg kialakításában. Ha QTL-ről beszélünk, akkor ez alatt a kromoszóma egy viszonylag szűk régióját értjük, mely azonban több gént is magában foglalhat.

A szárazságtűrést befolyásoló lókuszok általában kis hatásúak (*small* QTL), amelyek a fenotípusos variancia maximum 25% -áért felelősek (Price 2006) és az erős környezetei hatás miatt gyengén öröklődnek (*low heritability*) (Nguyen *et al.* 2004, Teulat *et al.* 2001b). A kis fenotípusos hatás miatt az ilyen QTL-ek finomtérképezése problematikus lehet, mivel az ehhez szükséges nagyszámú rekombináns egyed fenotípusa közötti különbség gyakran nem mérhető.

2.4.2. A genetikai térkép és a molekuláris markerek

A genetikai térkép lehetővé teszi, hogy egy adott faj teljes genomszekvenciájának ismerete nélkül, a rekombinációs gyakoriság alapján gének, QTL-ek vagy szekvenciák pozícióját meghatározzuk. A genetikai térképet öröklődő tulajdonságok nyomon követésére alkalmas úgynevezett markerek sorrendje alkotja. A térképszerkesztéshez meg kell határozni markerpáronként a rekombinációs gyakoriságot, amelyből térképfüggvények segítségével (Haldane 1919, Kosambi 1944;) a köztük levő térképtávolság kiszámítható, majd hárompontos térképezésekkel megállapítható a markerek egymáshoz viszonyított elhelyezkedése.

Markernek nevezünk minden olyan fenotípusos vagy genotípusos jellemzőt, amely alkalmas egy adott tulajdonság vagy folyamat egyértelmű jelölésére. Kezdetben morfológiai markereket használtak, majd a gélelektroforézis technika elterjedésével a biokémiai (izoenzim) markerek felhasználása vált általánossá. A 80-as évektől terjedtek el a molekuláris markerek, amelyek fehérje és/vagy DNS szinten azonosítják a polimorfizmust.

A DNS markerek alkalmazásának előnye, hogy nagyfokú variabilitást mutatnak, és a környezet, illetve a génkölcsönhatások nem befolyásolják megjelenésüket. DNS markerek lehetnek hibridizáció (pl.: RFLP - ***r**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism*, DArT - ***d**iversity **ar**ray **t**echnology*) vagy *PCR* (***p**olymerase **c**hain **r**eaction* – polimeráz láncreakció) alapú markerek (pl.: AFLP - ***a**mplified **f**ragment **l**ength **p**olymorphism*, SSR - ***s**imple **s**equence **r**epeat*, SNP - ***s**ingle **n**ucleotide **p**olymorphism*).

Az első árpa genetikai térképek RFLP markerekkel készültek (Heun *et al*. 1991, Graner *et al*. 1991), majd ezeket váltották fel az SSR és DArT marker alapú térképek (Wenzl *et al.* 2006, Stein *et al.* 2007).

A PCR alapú markerek közül az SSR markerek felhasználása a legszéleskörűbb. A növénybiológiában különösen gyakran használják, mert analízisük gyors, ismételhető és költséghatékony. A mikroszatellitek 6 bp-nál rövidebb szekvenciák tandem ismétlődései. A mikroszatellitek gyakorisága az egyes fajok genomjain belül változó. A növényi genomokban leggyakrabban az $(AC)_n$ és a $(GA)_n$ dinukleotid ismétlődések fordulnak elő amelyeket konzervatív szekvenciák határolnak (Gupta és Varshney, 2000). A mikroszatellit markerek túlnyomó része kodominánsan öröklődik, és a legtöbb esetben kromoszóma specifikusak is (Röder *et al.* 1998). Az allélikus különbséget a tandem ismétlődések számbeli eltérése jelenti. Az ismétlődések feltehetően a DNS polimeráz replikáció alatti megcsúszása következtében alakulhattak ki (*slippage model*: Levinson és Gutman 1987). A mikroszatellit markerek talán egyetlen hátránya azonban, hogy kifejlesztésük időigényes és költséges. Az ismétlődéseket határoló konzervatív szekvenciákhoz kifejlesztett primer pároknak mindössze 30 %-a használható genetikai vizsgálatokhoz (Röder *et al*. 1995). Az SSR markerek nagy mintaszám vizsgálatára is alkalmas módszerekkel (*high throughput methods*) kombinálva kiváló alapot nyújtanak a marker alapú szelekció megvalósítására.

A DNS szekvenáló és molekuláris marker technológiák akkor kezdtek közelíteni egymáshoz, amikor ugyanahhoz a fajhoz tartozó, de különböző genotípusból származó szekvenciaadatok is elérhetővé váltak. Hamar egyértelművé vált, hogy az egyetlen bázispárnyi pontmutációból eredő különbség meghatározásán alapuló SNP marker a genomban leggyakrabban előforduló markertípus (Chee *et al.* 1996). A humán és néhány modell szervezetre az SNP markerek vizsgálata már kidolgozott, a gabonafélék esetében azonban még korlátozott és költséges. Ennek oka elsősorban a szekvenciainformációk hiánya és a poliploid genomszerkezet.

A közelmúltban kidolgozott DArT módszer (Wenzl *et al.* 2006) azonban megteremtette az előzetes szekvenciainformációk nélküli egész genomra kiterjedő vizsgálatok (*profiling*) lehetőségét is. A DArT techológia első lépése, hogy restrikciós emésztést követően ismételhető módon kiválogatnak egy, a vizsgálni kívánt genomokat reprezentáló fragmenttartományt. Az alkalmazott enzimtől függően többféle genomreprezentáció is készülhet. Ezt követően a fragmenteket könyvtárakba klónozzák. A fragmentekből kéttípusú microarray-t készítenek. Az első az úgynevezett discovery array, amely a klónokból felszaporított random fragmeneteket tartalmazza. A második arrayen már csak a polimorfizmust mutató fragmentek találhatóak. A fragmenteket tartalmazó chipekre ezután visszahibridizálják az egyes genomok egyedi reprezentációját. A hibridizációt fluoreszcencia alapján pontozzák. A DArT markerek biallélikusak, lehetnek kodominánsak és dominásak is. A genetikai térképezéshez elsősorban a domináns öröklődésű DArT

markerek használhatóak. Ez a módszer nagy áteresztőképességű és költséghatékony, ezáltal nagy mintaszám gyors vizsgálatára alkalmas.

2.4.3. Térképezési populációk

Genetikai térképeket leggyakrabban homozigóta genotípusok keresztezéséből származó, rekombinás utódokból álló térképezési populációk segítségével állítanak elő. A populáció keresztezési partnereit adó vonalakat szülői vonalaknak nevezzük. Egy adott fenotípusos jelleg térképezésének feltétele, hogy a szülők a térképezni kívánt tulajdonságban különbözzenek egymástól. A populációt alkotó rekombináns vonalakban azonban olyan új allélkombinációk is kialakulhatnak, amelyek a szülői formáktól szignifikánsan eltérő fenotípust eredményeznek (transzgresszív szegregáció). Ilyen esetekben a folytonos eloszlást mutató fenotípus szélső értékeit nem a szülői vonalak mutatják. Minél több rekombináns egyedből áll egy térképezési populáció és minél nagyobb a polimorfizmus a szülői vonalak között, annál pontosabb lesz a kapcsoltsági térkép és a QTL analízis is.

Egy térképezési populáció előállításának számos módja van, amely egyben determinálja a leendő utódok genetikai hátterét is. Az ismételhető fenotípusos vizsgálatokhoz stabilan fenntartható genetikai alapanyagokra van szükség és a keresztezést követően homozigóta rekombináns vonalakat kell előállítani. Gyors és talán ezért igen elterjedt a mikro- vagy makrospóra eredetű dihaploid (DH) populáció (Snape *et al.* 1984). A mikrospóra eredetű vonalakat az F_1 nemzedék haploid mikrospóráiból állítják elő, melyekből kolchicines kezelést követően homozigóta diploid növények hozhatók létre (Jensen 1974). A makrospóra eredetű DH vonalakat interspecifikus keresztezéssel, árpában a *Hordeum bulbosum*-mal történő megporzással állítják elő (Chen és Hayes 1989). Az F_1 nemzedék megtermékenyített gamétáit makrospórakultúrában nevelik és szintén a kolchicin kezelés hatására jönnek létre a dihaploid vonalak. A vonalak mind homozigóták a különböző lókuszokban. A DH populációkat genetikai térképek megszerkesztésére (pl.: Costa *et al.* 2001; Graner *et al.* 1991), QTL-ek térképezésére (pl.: Hai *et al.* 2008, Peighambari *et al.* 2005) és nemesítési célokhoz is felhasználják. A módszer előnye, hogy a több generáción keresztül végzett önbeporzások helyett, az F_1 növények haploid gamétáiból egy lépésben kapunk homozigóta utódokat.

A hagyományos keresztezési populációkon kívül gyakoriak még a visszakeresztezett (***b**ack**c**ross,* BC), illetve a beltenyésztett vonalakból (***r**ecombinant **i**nbred **l**ines)* álló populációk is.

A térképezésre használt alapanyagok között említést érdemelnek az asszociációs vizsgálatokra használt úgynevezett asszociációs populációk is. Ezek a populációk nem klasszikus értelemben vett keresztezéssel előállított alapanyagok, hanem eltérő származású fajtákat, tájfajtákat és egyéb genetikai alapanyagokat tartalmazó fajtagyűjtemények. A kétallélos populációkkal szemben nagyszámú allél fenotípusos hatása vizsgálható. A fenotípus és a genotípus

asszociációjának meghatározásához az evolúció és a nemesítés során rögzült rekombinációs eseményeket használjuk. A térképezés maximális felbontása elsősorban a kapcsoltsági kiegyenlítetlenség (LD, ***l****inkage* ***d****isequilibrium*) mértékétől függ. Ha egy populáción vagy fajon belül az LD alacsony, azaz a különböző lókuszokhoz tartozó allélok előfordulása a rekombináció alapján elvárt értékhez közeli, akkor nagy felbontású térkép készíthető. Magas LD esetén az együtt öröklődő allélok miatt a térképezés felbontása alacsonyabb.

2.4.4. QTL analízis

A poligénes jellegek vizsgálata alapvetően statisztikai alapokon nyugszik. A jellegek kapcsolt markereken keresztüli vizsgálatának elvi alapjai régóta ismertek. Sax (1923) volt az első aki fenotípusos markereket használt a bab magméretét befolyásoló gének vizsgálatára egy hasadó F_2 populáción. A nagyfelbontású genetikai térképek és statisztikai szoftverek használatával a vizsgálni kivált tulajdonságokat befolyásoló régiók azonban jelenleg sokkal nagyobb pontossággal határozhatóak meg.

A legegyszerűbb módszer a QTL analízishez az ún. *single marker* analízis (Edwards *et al.* 1987). Ennek során minden egyes lókusz esetében egyedileg megvizsgáljuk van-e kapcsolat a fenotípusos adatok eloszlása és a markerallélok alapján képzett genotípus csoportok között. A vizsgált lókuszra vonatkozó homozigóta csoportok fenotípusos átlagát egyszerű variancia analízissel (SMA - ***s****ingle* ***m****arker* ***A****NOVA)* vagy lineáris regresszióval (SMR - ***s****ingle* ***m****arker* ***r****egression*) lehet összehasonlítani. A módszerrel azonban nem lehet a QTL pozícióját pontosan meghatározni, csak azt, hogy melyik markerrel kapcsolt legszorosabban. A módszer hibája kis markersűrűségű térképeknél jelentkezik. Kis hatás esetén nem lehet eldönteni, hogy valóban egy szorosan kapcsolt, kis hatású QTL-ről van szó, vagy egy távolabbi nagy hatásúról. Ezzel a módszerrel a többszörös, kapcsoltan elhelyezkedő QTL-ek gyakran nem detektálhatók.

Egy másik megközelítés szerint egy adott QTL az őt szegélyező két marker alapján is meghatározható. Ezen az elven alapuló QTL detektálási módszert intervallum térképezésnek nevezzük (IM - ***i****nterval* ***m****apping*) (Lander és Botstein, 1989). Ebben az esetben a feltételezett QTL-t szegélyező markerpárokat (*flanking markers*) és nem csupán egyedi markereket vizsgálunk. Az analízis során minden egyes intervallumra meghatározható az adott QTL előfordulásának valószínűsége. Egy finom felbontású genetikai térképen, így a teljes genomot lefedhetjük ezekkel a valószínűségi értékekkel.

Létezik az intervallum térképezés regresszión alapuló kevésbé számításigényes változata is, amit egyszerű intervallum térképezésnek nevezünk (SIM - ***s****imple* ***i****nterval* ***m****apping*, Haley és Knott, 1992). A regressziós módszerrel kapott QTL-ek hatása és pozíciója általában közel azonos a

maximum-likelihood módszerrel kapott eredményekkel (Haley és Knott 1992), azonban episztázis és kapcsolt QTL-ek esetében az IM módszert megbízhatóbbnak tekintik (Kao 2000).

Ezek a megközelítések a QTL-ek nagy pontosságú becslését teszik lehetővé, amennyiben a populáció nem tartalmaz egynél több, az adott jelleget befolyásoló QTL-t a vizsgált kapcsoltsági csoportban. Ahhoz, hogy egy kromoszómán egyszerre több szegregáló QTL-t is nagy pontossággal azonosíthassunk, összetett intervallum térképezést (CIM - ***c**omposite **i**nterval **m**apping* vagy MQM-Mapping - ***m**ultiple **Q**TL **m**odel-**m**apping*, Jansen 1993, Zeng 1994) kell alkalmaznunk. Ez a megközelítés az egyedi QTL-ek azonosításából, és a vizsgált intervallumon kívül található markerekkel történő regressziós analízisből áll. A többszörös intervallum térképezés (MIM - ***m**ultiple **i**nterval **m**apping*, Kao *et al.* 1999) és a kevert modellen alapuló összetett intervallum térképezés (MCIM - ***m**ixed-model-based **c**omposite **i**nterval **m**apping*, Yang és Zhu 2005) párhuzamosan több intervallumot használ. Ezekkel a módszerekkel a QTL kölcsönhatások, QTL és a környezet kölcsönhatása, és az adott QTL örökíthetősége is becsülhető. A QTL analízis különböző változatai egyre több – akár ingyenesen is elérhető - szoftver segítségével pontosan és gyorsan végrehajthatóak (QTLNetwork: Yang és Zhu 2005, MapQTL: Van Ooijen 2004).

Irodalmi adatok alapján egy adott QTL megbízhatósági tartománya (konfidencia intervalluma) általában nagy, gyakran 10 cM-től akár 30 cM-ig terjedő régiót fed le (Kearsey és Farquhar 1998). Ez a pontosság a marker alapú szelekcióhoz még megfelelő lehet, azonban a térkép alapú klónozást már nem teszi lehetővé. Ebből adódhat az az általános vélemény is, hogy a QTL analízis nem ad elég pontos eredményt. Ezt a tévhitet oszlatta el Price (2006), aki példákat hozott finomtérképezett jelölt génekre, amelyeket korábban QTL analízissel is azonosítottak a később meghatározott pozíciókhoz igen közel. A jelölt gének és a korábbi független ismétlésekben meghatározott QTL-ek átlagolt csúcs pozíciója általában egy 2 cM-os región belül, de egyes esetekben még ennél is közelebb helyezkedett el. A QTL analízis pontosságát Price (2006) vizsgálatai alapján a populációt alkotó rekombináns vonalak és a független ismétlések számának növelésével is javítani lehet.

2.4.5. QTL szignifikancia küszöbérték meghatározására alkalmas módszerek

A QTL adott lókuszban való előfordulásának valószínűségét - kiszámításának módjától függetlenül - leggyakrabban a LOD értékkel (***l**ogarithm of **od**ds*, Sturt 1975) az LR értékkel (***l**ikelihood **r**atio*, Jansen 1996) vagy az F értékkel (***F**isher-Snedecor value*, Carbonell *et al.* 1993) adják meg.

A LOD értéket a feltételezett QTL meglétének és hiányának valószínűségéből számolhatjuk ki: LOD=$\log_{10}$ [feltételezett QTL meglétének maximális valószínűsége / a feltételezett QTL hiányának maximális valószínűsége]. LOD=2 tehát azt jelenti, hogy 10^2=100-szor nagyobb annak a

valószínűsége, hogy az adott pozícióban QTL van, mint annak a valószínűsége, hogy nincs. A legnagyobb szignifikáns hatással, azaz a legnagyobb LOD értékkel rendelkező pozícióban a legvalószínűbb az adott QTL előfordulása. Az LR érték a LOD érték $2\log_e^{10}$-szerese. Az F-érték az F-teszt eredménye, amelynek nullhipotézise, hogy a vizsgált változók egy bizonyos folytonos valószínűségi eloszlást (F-eloszlást) követnek. Ez a módszer különböző statisztikai modellek összehasonlítására használható abból a célból, hogy esetünkben kiválasszuk azt a QTL modellt, amely a legjobban magyarázza a populáción megfigyelt fenotípusos eloszlást.

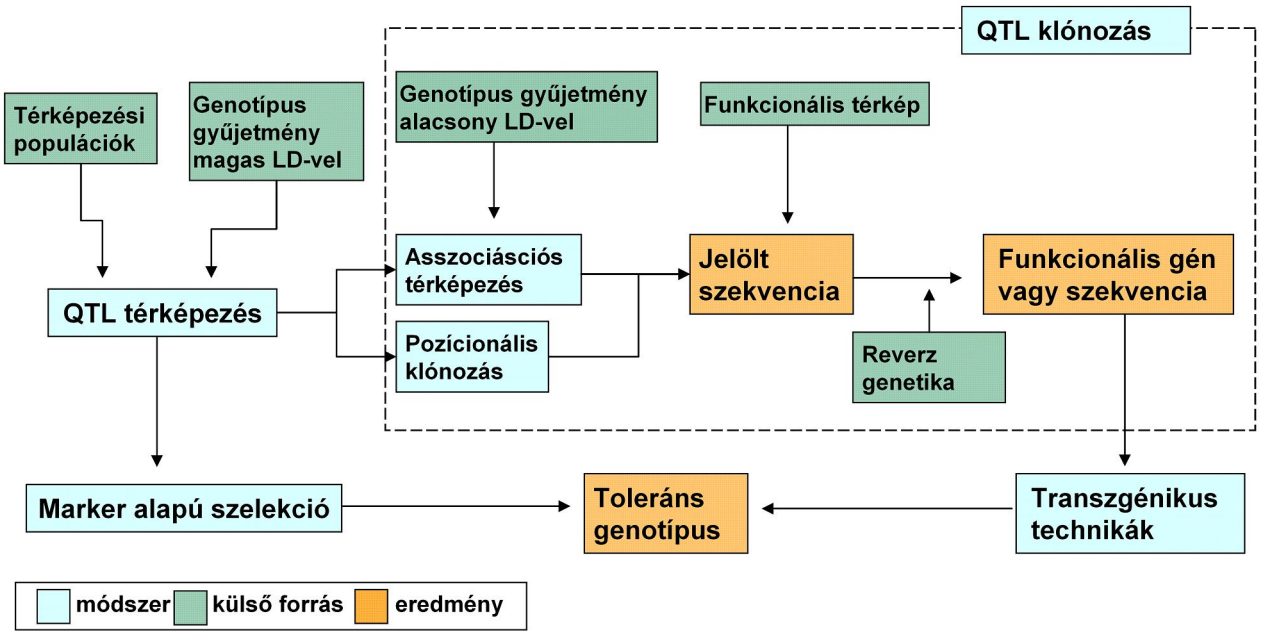
A szignifikancia küszöbértékének megállapításához mind analitikus (becslést, megközelítést alkalmazó), mind empirikus (tapasztalati, a kapott adatok permutációjára épülő) módszerek felhasználhatók.

A szignifikancia küszöbértékének meghatározásához leggyakrabban a permutációs tesztet használják (Churchill és Doerge, 1994). A módszer lényege, hogy nagyszámú ismétléssel (ún. iterációkkal) a teszt statisztika maximum értékének gyakorisági eloszlását tapasztalati úton határozzák meg. Minden egyes ismétlésben a fenotípusos adatokat véletlenszerűen rendelik az egyes genotípusokhoz, amelyet minden lépésben egy intervallum térképezés követ. A véletlenszerűen elrendezett adatokból kapott értékek gyakorisága megmutatja, hogy mekkora a hamis (*false positive*) QTL detektálásának valószínűsége. Az általunk kapott adott QTL-re vonatkozó teszt statisztika értékének magasabbnak kell lennie, mint a használt szignifikancia küszöbértékhez tartozó fenotípusos adatok véletlenszerű elrendezésével kapott érték.

2.4.6. QTL analízis szerepe az abiotikus stressztűrés vizsgálatában

A QTL analízis során azonosított lókuszokhoz kapcsolt markerek elősegíthetik a vizsgált jelleg marker alapú szelekcióját és ezáltal közvetlenül hozzájárulhatnak toleráns genotípusok szelektálásához. Az egyes QTL-ek mögött elhelyezkedő gént vagy géneket pozícionális klónozással és asszociációs analízissel lehet részleteiben feltárni. Pozícionális klónozás esetén szükség van egy olyan nagy egyedszámú populációra, amelyben csak a vizsgált QTL régió szegregál. Ennek előállítása meglehetősen időigényes. Az asszociációs analízis során független vonalak allélelosztása közötti statisztikai kapcsolatokat elemzünk, ezáltal a térképezési populációk időigényes előállítása nem szükséges. A nagy LD-vel rendelkező asszociációs populációk (~100 kb vagy több) csak alacsony felbontású térképezést tesznek lehetővé. Ezzel ellentétben, ha az LD alacsony (~10 kb vagy kevesebb) a térképezés felbontása elég nagy lehet ahhoz, hogy az azonosított QTL intervallum csak egy vagy néhány gént tartalmazzon. Ezek az eredmények új, stressztűrésben szerepet játszó gének azonosítását tehetik lehetővé. Toleráns genotípusok előállítását a transzgénikus módszerek is segíthetik, azonban szántóföldi alkalmazásuk a szárazságtűrés tekintetében eddig nem hozta meg a várt sikert. Ennek feltételezhető oka, hogy a szárazságtűrés egy komplex, több génes jelleg, és az

egyes egyedi gének szerepe - fenotípusos hatása - csak specifikus környezetben érvényesül. A növények abiotikus stressztűrésének fokozására általánosan használt genetikai módszereket a **4. ábra** foglalja össze.



4. ábra

QTL analízis szerepe az abiotikus stressztűrés javításában Tuberosa és Salvi (2006) alapján

QTL: quantitative trait loci, LD: linkage disequilibrium

2.4.7. Heritabilitás

A heritabilitás vagy örökíthetőség (h^2, H^2) fogalma azt fejezi ki, hogy a genetikai faktorok mekkora arányban vesznek részt az adott fenotípusos jelleg kialakításában. Az örökíthetőség azonban nem egy jelleg, hanem a vizsgált populáció jellemzője. Megkülönböztetünk szűk (*narrow-sense)* és tág (*broad-sense)* értelemben vett heritabilitást. A szűkebb értelemben vett heritabilitás megmondja, hogy az additív hatással rendelkező genetikai faktorok által okozott variancia (V_A) mekkora hányadát teszi ki a teljes fenotípus varianciának (V_P). Kiszámítása a $h^2 = V_A / V_P$ egyenlőséggel lehetséges, ahol $V_P = V_G + V_E + V_{E\times G} + V_e$ (V_G: a genetikai eredetű fenotípusos variancia, V_E: a környezeti eredetű variancia, $V_{E\times G}$ a környezet és a genetikai faktorok kölcsönhatásából eredő variancia, V_e: a reziduális variancia) (Falconer és Mackay 1996). Ez a paraméter az alkalmazott kutatás szempontjából különösen fontos, mert a szelekció hatékonyságára, szelektálhatóságra lehet belőle következtetni. A tágabb értelemben vett heritabilitás ellenben azt jelzi, hogy az adott jelleg mennyire öröklődik az adott populáción belül. Kiszámítása a $H^2 = V_G / V_P$ képlettel lehetséges. A V_G-t az interakciókból (episztázisból) eredő variancia (V_I), a dominanciából eredő variancia (V_D) és a V_A összege határozza meg.

2.5. Szárazságstressz modellezésére használt kísérleti megközelítések

Az alkalmazott kutatások célja a vízhiányos környezetben történő termésképzés folyamatának megismerése és végső soron a termés mennyiségének növelése. A szárazságtűrés és egyes részjelenségeinek modellezésére számos általánosan elfogadott, egyszerűsített módszer létezik, azonban teljes komplexitásában csak a több környezetben elvégzett szántóföldi kísérletek során vizsgálható. Mivel a korai fejlődési fázisokban fellépő stresszhatások is nagyban befolyásolják a termőképességet, az ilyenkor fellépő vízhiány hatásai és az okozott károsodás mértékének tanulmányozása szintén kulcsfontosságú. Összességében a több fejlődési fázisban elvégzett vizsgálatok szolgáltathatnak átfogó képet a stressztűrésről.

Az ozmotikumban (poli-etilén-glikol, mannitol) történő nevelés vagy csíráztatás élettani és molekuláris vizsgálatokhoz gyakran használt módszer (pl.: Kocsy *et al.* 2004), amely egyszerűen kivitelezhető és jól ismételhető. Gyakorlati hasznáról és a szántóföldi körülményekkel való összevethetőségéről azonban megoszlanak a vélemények (Cseuz 1990).

A talajban végzett, vízelvonást alkalmazó cserepes kísérletek hasonlítanak legjobban a természetes szárazságstresszhez, azonban nagyszámú, egyedi cserepekben nevelt genotípus összehasonlítása és a vízelvonás mértékének beállítása nehézkes. Ezen kívül az egyedileg nevelt növények másképpen viselkednek, mint a tömegben nevelt növények, amit a kísérleti eredmények értékelésénél célszerű figyelembe venni. Ez a kontrollált körülmények között is elvégezhető kísérlettípus azonban ideális feltételeket biztosít a szárazságtűréshez kapcsolódó élettani és molekuláris vizsgálatok elvégzéséhez.

A termésképzés szempontjából kiemelkedő fontosságú tápanyagmobilizációs képesség mérésére alkalmas szántóföldön is alkalmazható módszer a kémiai deszikkáció (Royo és Blanco 1998). A virágzás utáni kémiai szerekkel történő deszikkálás a fotoszintetizáló szövetek károsodását és a levelek leszáradását okozza (Blum *et al.*1991). Ez a megközelítés jól modellezi a virágzáskori vízhiányos állapotot, amikor a szemtelítődés elsősorban a szárban raktározott mobilizálható tápanyagok felhasználásával mehet végbe.

2.6. Az árpa, mint modellnövény

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) termesztési területe alapján a kukorica, rizs és búza után a negyedik legfontosabb gabonaféle világszerte. Európában a búza és kukorica után a harmadik legfontosabb gabonanövény, melyet a sörgyártás során malátázásra, takarmányként és étkezési célra is felhasználnak. Magyarországon inkább a takarmány és söripari célú felhasználás a jellemző, azonban – követve a nemzetközi trendeket – az étkezési célú felhasználás részarányának növekedése várható. Az általunk is vizsgált tavaszi árpa esetében a legfontosabb nemesítési cél az

abiotikus és biotikus stresszrezisztencia fokozása a sörgyártás támasztotta szigorú minőségi összetevők módosítása nélkül.

Az árpa amellett, hogy fontos mezőgazdasági növényünk, genetikai térképezésre és térkép alapú vizsgálatokra is kiválóan alkalmas (Costa *et al.* 2001). Diploid genommal (2n = 42 = 2x) és hét kromoszómával rendelkezik, amelyek homeológok a búza kromoszómáival. Emiatt a poliploid gabonafélék modell növényének tekintik.

A termesztett árpa vad őse (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) kétsoros, túlnyomóan öntermékeny és széthulló kalászú, egyéves növény. Termesztett változata szintén többsoros (kettő-, négy-, hatsoros), de kalásza érést követően már nem hullik szét. Az árpa a fűfélék családjába (*Poaceae*) és a *Triticeae* tribuszba tartozik, amely számos mérsékeltövi gabonafélét (búza, rozs, tönköly, stb.) foglal magába. Régészeti leletek alapján termesztése kb. 10 ezer évvel ezelőtt Elő-Ázsiában, a termékeny félhold vidékén kezdődött.

2.6.1. Az árpa szárazságtűrésének genetikai kontrollja

A szárazságtűréssel kapcsolatba hozható jellegekre vonatkozó irodalom rendkívül kiterjedt. Nagyon sok olyan genomi régiót és gént azonosítottak már, amely részt vesz a vízhiánnyal szembeni tolerancia kialakításában (pl.: ABA akkumuláció, Tuberosa *et al.* 1998) vagy szerepet játszik a termésmennyiség növelésében szárazság alatt (pl.: HVA1, Bahieldin *et al.* 2005). Dolgozatomban elsősorban azokat az árpán elért szárazságtűréssel kapcsolatos eredményeket szeretném áttekinteni, amelyek szántóföldi vizsgálatokra alapozott, terméseredményekkel összefüggő adatokat szolgáltatnak.

Viszonylag kevés azoknak a publikációknak a száma, amelyek szántóföldi körülmények között, vízhiányos környezetben vizsgálták az agronómiai jellegek genetikai hátterét árpában. A legrészletesebb ilyen irányú kísérleteket, amelyek során szárazságtűréshez kapcsolódó agronómiai és fiziológiai jellegeket egyaránt vizsgáltak a 'Tadmor' × 'Er/Apm' keresztezésből származó térképezési populáció felhasználásával végezték. Különböző környezetben, szántóföldi és üvegházi kísérleteket követően térképezték az ozmotikus adaptációs képességet, a stressz alatti vízháztartást jellemző paramétereket (relatív víztartalom, vízpotenciál), vízoldható szénhidrát tartalmat meghatározó lókuszokat, szén izotóp diszkriminációs képességet, valamint agronómiai jellegeket (Teulat *et al.* 1998, 2001a, 2002, von Korff *et al.* 2008). Ezen a populáción ezt követően számos stresszhez kapcsolt EST-t és egyéb jelölt gént is térképeztek (Diab *et al.* 2004). A legnagyobb hatású lókuszokat a 1H, 3H, 5H és 6H kromoszómákon azonosították.

Az 'Arta' × '*H. spontaneum* 41-1' populáció vizsgálatával agronómiai jellegeken kívül a stressz alatti növénymagasságot befolyásoló lókuszok térképezését tűzték ki célul (Baum *et al.* 2003). A nagyobb növénymagasságot (a feltételezhető nagyobb gyökér miatt) mediterrán környezetben a szárazságtűréssel összefüggő fontos jellegek egyikének tartják, és ezek alapján a *H.*

spontaneum-ból származó előnyös allél introgressziója elősegítheti szárazságtűrő gabonafélék előállítását. Szárazságstressz során a növénymagasságot befolyásoló lókuszokat a 2H, 3H és a 7H kromoszómákon azonosították, amelyek közül a 3H-án található pleiotróp hatású QTL a termést is befolyásolta.

Talame és munkatársai (2004) szintén vad árpa és termesztett árpa keresztezéséből származó populáció segítségével azonosítottak olyan régiókat, amelyek a termést és más agronómiai jellegeket befolyásoltak. A termést befolyásoló QTL-ek döntő többségében (12 QTL) az additív hatás a termesztett árpából származott, azonban a 2H, 3H, 5H és a 7H kromoszómákon azonosított hat régió esetében a *H. spontaneum*-ból. Több környezetben és a legnagyobb additív hatással a *Bmac0093* (2H) és a *Bmac0684* (5H) markerekhez kapcsolt régiókat azonosították. Ezek az eredmények jelzik annak lehetőségét, hogy közel rokon vad fajokból származó előnyös allélok segíthetik termesztett fajták adaptációját vízhiányos környezetben. Figyelembe véve azonban azt, hogy a nagy termőképességű fajták csak igen kifejezett stressz esetén teremnek kevesebbet, mint az alacsonyabb termőképességű, de stressztűrőbbnek tartott genotípusok (Blum 2005), ezen allélok valószínűleg csak súlyos vízhiány esetén előnyösek.

Azok a genomi régiók, amelyek több, különböző vízellátottságú környezetben is pozitív hatást gyakorolnak a terméseredményekre, feltehetően szintén a termésmennyiség növeléséhez kapcsolható nem stressz-specifikus gének hatása miatt - és nem feltétlenül a szárazságtűrésben betöltött szerepük miatt – fejtik ki hatásukat. Ezért lehetséges az is, hogy modern fajták termesztésével az átlagos termésmennyiség szárazabb években is növekedett az adaptációban szerepet játszó gének pontos ismerete nélkül. Ezért a temőképességgel összefüggő és az adaptációban szerepet játszó lókuszoknak az elkülönítéséhez elengedhetetlen a fenotipizálás több környezetben történő elvégzése (pl.: von Korff *et al.* 2008, Maccaferri *et al.* 2008). Köztudott, hogy a nagy termőképességű fajták termésmennyisége stressz hatására nagyobb arányban csökkenhet, azonban csak nagyon kifejezett stressz esetén alacsonyabb, mint a vízhiányhoz jobban adaptálódott, de alacsonyabb termőképességű genotípusoké (Blum 2005). Ahhoz, hogy az adaptációban szerepet játszó lókuszokat azonosíthassuk, olyan körülményeket kell alkalmaznunk (erős vízhiány), amikor a fajták termőképességében meglévő előny kisebb, mint az adaptációból származó tolerancia által kifejtett pozitív hatás.

Jelenlegi ismereteink szerint a 'Tadmor' × 'Er/Apm' populáción elvégzett szántóföldi vizsgálatsorozat a legjelentősebb tanulmány árpán, amely 14 agronómiai jelleg genetikai hátterét vizsgálta erős vízhiány mellett, mediterrán környezetben (von Korff *et al.* 2008). Az azonosított markerek elsődleges additív hatása minden esetben a nagyobb termőképességű 'Er/Apm' genotípustól származott. Ellenben a legerősebb stresszel jellemzett környezetekben olyan lókuszokat is azonosítottak, amelyek additív hatása az alacsonyabb termőképességű, de toleránsnak

tartott 'Tadmor'-ból származó allélnak volt tulajdonítható. A legnagyobb ilyen kereszthatással rendelkező markert az 1H-án azonosították.

Ezen eredményeket összefoglalva elmondhatjuk, hogy mérsékelt vízhiány esetén elsősorban a termőképességet is befolyásoló lókuszok/gének a meghatározóak, és csak nagyon erős stressz esetén érvényesülhet a termésben a kifejezetten szárazságtűréshez kapcsolható gének előnyös szerepe (Blum 2005).

A kétszülős populációkon elért eredmények nagyobb genetikai variabilitással rendelkező alapanyagokon sajnos eddig nem lettek megerősítve, így az alkalmazott kutatás számára ezek használhatósága még nem igazolt.

2.6.2. Az árpa fizikai térképezése

A gabonafélékre jellemző, hogy nagy méretű és repetitív szekvenciákban gazdag genommal rendelkeznek. A árpa genomja nagyjából 5,6 x 10^9 bp amelynek közel 80 %-a repetitív szekvencia (Benett és Leitch 2003). A teljes árpagenom szekvenciája jelenleg nem ismert, azonban fizikai térképezése és a fizikai térkép genetikai térképhez való kapcsolása nagy erőkkel folyik. Ebből a szempontból az észak-amerikai hatsoros 'Morex' sörárpafajta referencia genotípusnak számít. Ennek a genotípusnak publikálták elsőként a teljes genom lefedettséget elérő BAC (***b**acterial **a**rtificial **c**hromosome*) könyvtárát (6,3-szoros haploid genom lefedettség, Yu *et al.* 2000). A 2006-ban több kutatócsoport részvételével alakult Nemzetközi Árpa Genom Szekvenáló Konzorcium (*International Barley Sequencing Consortium*, http://barleygenome.org) keretében pedig célul tűzték ki a 14-szeres genom lefedettséget elérő fizikai térkép elkészítését.

A rendelkezésre álló szekvenciaadatok korlátozottsága miatt az EST szekvenciákon alapuló szisztematikus gén izolálás a *Triticeae* fajok esetében egyelőre kulcsfontosságú (Varshney *et al.* 2006). Jelenleg 501 614 árpa EST (*H. vulgare* + sub. *vulgare)* és 23 595 Unigene található az NCBI dbEST adatbázisban (***N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation*, 2009. 11. 13., http://www.ncbi.nlm.nih.gov /dbEST/ dbEST_summary.html). A HarvEST adatbázis (non-redundant) ismétlések nélküli annotációja szerint a 444 652 egyedi EST 22 937 contig-ot/Unigene-t alkot. (*HarvEST: Barley 1.68 assembly 35:* http://harvest-web.org). A különböző fejlődési fázisokból és környezetből származó cDNS könyvtárak és az Affymetrix 22K Barley1 GenChip-el jelentős számú árpa gén expressziójának és funkciójának vizsgálatára is lehetőség van (Close *et al.* 2004).

2.7. Marker alapú szelekció

Irodalmi adatok alapján, a stresztűrésben szerepet játszó jellegekhez kapcsolt molekuláris markerek hatékonyan használhatóak betegségellenáló genotípusok szelektálására (Schmalenbach *et al.* 2008). Molekuláris markerek használatával a hosszadalmas fenotípusos elemzések időigénye

csökkenthető, és a hasadó genetikai alapanyagok számunkra előnyös tulajdonsággal rendelkező vonalainak kiválasztása egyszerűsíthető. Búzában szárazság alatt a szemtermést befolyásoló QTL-ekhez kapcsolt markereket már azonosítottak (Kirigwi *et al*. 2007) és lehetséges alkalmazásukat is megvizsgálták (Kobiljski *et al*. 2007). Árpában szintén azonosítottak már vízhiányos környezetben termőképességet befolyásoló régiókat (von Korff *et al.* 2008), azonban ezek gyakorlati alkalmazhatóságát még nem vizsgálták. Szárazságtűrés esetében a marker alapú szelekciót jelentősen hátráltatja, hogy az azonosított termést befolyásoló QTL-ek általában kis fenotípusos hatással rendelkeznek. A közelmúltban azonban sikerült azonosítani egy termést befolyásoló nagyhatású QTL-hez kapcsolt SSR markert rizsben (Venuprasad *et al.* 2009*)*. A toleráns szülői fajtából származó allél közvetlenül felhasználható érzékeny fajták szárazságtűrésének fokozására. A rizsben elért eredmények ellenére a szárazságtűrés marker alapú szelekciójának megvalósítása egyelőre több, egyenként kis fenotípusos hatással rendelkező régióhoz kapcsolt marker alkalmazásával tűnik reálisnak.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérletbe vont növényi anyagok

3.1.1. Szárazságtűrés térképezésére alkalmas populáció kiválasztása

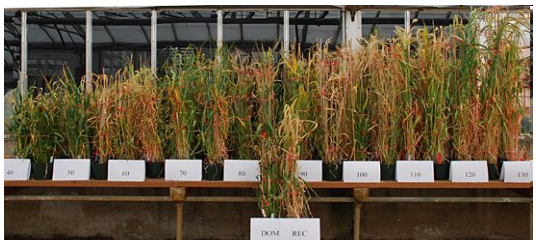
Előkíséleteink során négy árpa térképezési populáció ('DOM'×'REC', 'Steptoe'×'Morex', 'Brenda'×'HS213', 'Brenda'×'HS584') hét szülői vonalát teszteltük csíranövény és fiatalnövény tesztekben abból a célból, hogy eldöntsük melyik szülőpár ozmotikus stresztűrése különbözik a legjobban, és ezáltal melyik populáció a legalkalmasabb a térképezési vizsgálatokra. A 'Tadmor' és 'Er/Apm' tavaszi árpa genotípusokat referenciaként használtuk, mivel ezekből a vonalakból származó keresztezési populáción számos szárazságtűréssel kapcsolatos jelleget térképeztek korábban.

Az általunk vizsgált genotípusok közül a 'DOM' és a 'REC' genetikai anyagok, az Oregon Wolfe Barley (Costa *et al.* 2001) tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* subs. *vulgare*) populáció szülői vonalai. A 'Steptoe' egy nagy termőképességű, hatsoros tavaszi takarmányárpafajta, a 'Morex' egy szintén hatsoros, tavaszi sörárpa. A két fajta F1 nemzedékéből létrehozott DH populáció (Kleinhofs *et al.* 1993) és az OWB populáció, részletesen geno- és fenotipizált, széleskörben alkalmazott referencia populációk (Varshney *et al.* 2007). A 'Brenda' ismert német tavaszi sörárpa, a 'Brenda' × 'HS584' (Li *et al.* 2006) és a 'Brenda' × 'HS213' (Li *et al.* 2005) BC_3-DH populációk visszakeresztezett, rekurrens szülői vonala. A 'HS213' és a 'HS584' tavaszi vadárpa fajok (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) a gaterslebeni IPK génbankjának (*Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*, Gatersleben, Németország) HOR 12530 és Sp. 584 szám alatt nyilvántartott tételei. A 'DOM', 'REC', 'Steptoe', 'Morex', 'Tadmor' és 'Er/Apm' genotípusokból a magokat Andreas Börner (IPK, Gatersleben, Németország), míg a 'Brenda', 'HS213' és 'HS584' vonalakból a magokat Marion Röder (IPK, Gatersleben, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre.

3.1.2. Az Oregon Wolfe Barley populáció

A szárazságtűrés részletes vizsgálatára előkísérleteink eredményei alapján az OWB populációt választottuk ki. Az OWB populáció egy 94 DH vonalból álló doubled-haploid (DH) populáció, amelyet eredetileg morfológiai jellegek térképezésére fejlesztettek ki (**1. kép**). A populáció szülői vonalait adó kizárólag domináns ('DOM'), illetve recesszív ('REC') morfológiai jellegeket hordozó genotípusokat Bob Wolfe kanadai genetikus következetes visszakeresztezésekkel állította elő (Wolfe és Franckowiak 1991). Ez az alapanyag egy általános genetikai háttér speciális mozaikja, amelyben az ellentétes - domináns és recesszív - fenotípusos jellegeket meghatározó alléllok szétválasztva, külön genotípusban találhatók. Az OWB populációt és első genetikai térképét Costa és munkatársai (2001) állították elő, amelyet később részletesebb

térképek is követtek (Stein *et al*. 2007, Szűcs *et al*. 2009). A populációt alkotó DH vonalak fenntartását az Oregon Állami Egyetem végzi (Patrick Hayes). A populáció szabadon felhasználható kutatási célokra. A dolgozatban bemutatott vizsgálatokhoz a populációt német együttműködő partnerünk (Andreas Börner, IPK-Gatersleben) bocsátotta rendelkezésünkre.



1. kép

Az OWB populáció néhány vonala
(forrás: http://barleyworld.org/barleyimagegallery.php)

3.1.3. Az árpa gyűjtemény

A kétszülős keresztezési populáció felhasználásával kapott eredményeinket egy nagyobb genetikai variabilitással rendelkező anyagon is szerettük volna megerősíteni. Ezekhez a vizsgálatokhoz az ICARDA (***I**nternational **C**enter for **A**gricultural **R**esearch in the **D**ry **A**reas*, Aleppo, Szíria) által összeállított asszociációs gyűjteményből származó 39, véletlenszerűen kiválasztott vonalat használtuk fel. A tájfajtákból és fajtákból álló árpagyűjteményt Michael Baum (ICARDA, Szíria) bocsátotta rendelkezésünkre. Az egyes genotípusok származását és besorolását (tájfajta vagy fajta) az **1. táblázat** mutatja be.

1. táblázat. Az árpagyűjtemény genotípusainak származása. A *dőlt betűvel* jelölt genotípusok fajtákat, a normál betűvel jelöltek tájfajtákat jelölnek.

Azonosító	Típus	Származás	*Azonosító*	*Név*	*Típus*	*Származás*
UR029	tavaszi	Afganisztán	*UR126*	*Arta*	tavaszi	*ICARDA*
UR003	tavaszi	Afganisztán	*UR130*	*Zanbaka*	fakultatív	*ICARDA*
UR025	tavaszi	Irán	*UR131*	*Slb05-96*	fakultatív	*ICARDA*
UR118	fakultatív	Jordánia	*UR134*	*Zanbakian*	fakultatív	*ICARDA*
UR033	tavaszi	Szíria	*UR138*	*Alanda-01*	tavaszi	*ICARDA*
UR064	fakultatív	Szíria	*UR139*	*Martin*	tavaszi	*Tunézia*
UR031	tavaszi	Törökország	*UR140*	*Saida*	tavaszi	*Algéria*
UR005	tavaszi	Etiópia	*UR142*	*Manel*	tavaszi	*Tunézia*
UR009	tavaszi	Azerbajdzsán	*UR144*	*Express*	fakultatív	*Franciaország*
UR006	fakultatív	Etiópia	*UR149*	*Radical*	fakultatív	*Oroszország*
UR021	fakultatív	Irán	*UR150*	*Bulbul*	fakultatív	*Törökország*
UR098	fakultatív	Irán	*UR151*	*Matnan-01*	tavaszi	*ICARDA*
UR026	tavaszi	Irán	*UR153*	*Salmas*	tavaszi	*ICARDA*
UR091	fakultatív	Líbia	*UR155*	*Mari/Aths*2*	fakultatív	*Ciprus*
UR011	tavaszi	Líbia	*UR157*	*Giza 125*	tavaszi	*Egyiptom*
UR041	tavaszi	Marokkó	*UR158*	*Giza126*	tavaszi	*Egyiptom*
UR110	fakultatív	Pakisztán	*UR162*	*Sadik-2*	fakultatív	*ICARDA*
UR046	fakultatív	Pakisztán	*UR164*	*Katara*	tavaszi	*Líbia*
UR093	tavaszi	Törökország	*UR166*	*Momtaz*	tavaszi	*ICARDA*
			UR175	*Atsa*	tavaszi	*Eritrea/Izrael*

3.2. A térképezési populáció kiválasztása

3.2.1. Csíranövény teszt

A kilenc szülői vonalból származó szemeket két réteg nedvesített szűrőpapíron, átlátszó műanyag dobozban csíráztattuk. Egy dobozban (23 cm × 29 cm) hét genotípust, genotípusonként pedíg tíz szemet helyeztünk el. A dobozon belüli keveredést műanyag elválasztók segítségével akadályoztuk meg. Kontroll körülmények között csapvízzel, az ozmotikus stressz kezelés esetében 15 w/v %-os poli-etilén-glikol (PEG) 6000 (Merck, Darmstadt, Németország) oldattal nedvesítettük a szemeket. A kísérletet kontrollált körülmények között 20 ºC-on, 12 órás megvilágítás mellett, G-30 típusú növénynevelő kamrában (Conviron, Manitoba, Kanada) végeztük. A kilenc szülői vonalat két független ismétlésben teszteltük. Ismétlésenként minden genotípusból tíz kontroll és tíz kezelt növényt vizsgáltunk, de az adatelemzéshez az öt legnagyobb hajtáshosszal rendelkező csírázott növény adatait használtuk fel. A kísérlet 8. napján a növények hajtás- és gyökérhosszát határoztuk meg.

3.2.2. Fiatalnövény teszt

A gyökérrel és hajtással rendelkező szülői vonalak előcsíráztatott szemeit tápoldatra helyeztük (kb. egy hetes korban) és vízkultúrás kísérleti rendszerben, növénynevelő kamrában (PGR-15, Conviron, Manitoba, Kanada) 7 napig 14 órás megvilágítás, 500 μmol m^{-2} s^{-1} fényintenzitás mellett, 18/13 ºC (éjszaka/nappal) hőmérsékleten neveltük. A szemek egy műanyag tálcán helyezkedtek el a tápoldatos edény felületén, a gyökerek egy kb. 5 mm átmérőjű furaton keresztül átnőve érintkeztek a tápoldattal. Tápoldatként Hoagland-oldatot (pH: 5,8) használtunk, amelynek összetétele a következő volt:

Tápoldat (10 liter):
- 1 l Makrotörzsoldat
- 2,5 ml mikrotörzsoldat
- 100 ml Fe(III)-EDTA törzsoldat

Makrotörzsoldat (1 liter):
- 5,055 g KNO_3
- 11,81 g $Ca(NO_3)_2 . 4 H_2O$
- 4,932 g $MgSO_4 . 7 H_2O$
- 1,361 g KH_2PO_4

Mikrotörzsoldat :
- 286 mg H_3BO_3
- 362 mg $MnCl_2 . 4 H_2O$
- 22 mg $ZnSO_4 . 7 H_2O$
- 12 mg $Na_2MoO_4 . 2 H_2O$

Fe(III)-EDTA törzsoldat (1 liter):
- 4 g Fe(III)-EDTA

Az ozmotikus stresszt 15 w/v %-os, illetve 18 w/v %-os PEG 6000-et (Merck, Darmstadt, Németország) tartalmazó tápoldattal idéztük elő. Ez a koncentráció a tápoldat ozmotikus

potenciálját -0,72 MPa illetve -1,14 MPa értékre csökkentette. A stresszkezelést a tápoldatra rakást követő nyolcadik napon kezdtük, és a PEG koncentrációját hét napos ciklusokban növeltük. A 15%-os PEG kezelést követően a növények hajtáshosszát mértük, a 18 %-os PEG kezelés után, a kísérlet végén meghatároztuk a növények hajtás száraztömegét, relatív víztartalmát (RWC - ***r**elative **w**ater **c**ontent*), ozmotikus potenciálját (OP) és az ozmotikus adaptáció (OA) mértékét is. A stresszkezelés mellett minden esetben normál tápoldaton nevelt növényeket alkalmaztunk kontrollként. Minden genotípusból 10-15 növényt neveltünk egy másfél liter térfogatú edényben, kezelésenként két ismétlésben.

A növények relatív víztartalmát az RWC = (FW-DW) / (SW-DW) × 100 képlet alapján számoltuk ki (Barrs és Watherley 1962). A friss tömeget (FW - ***f**resh **w**eight*) egy 2 cm-es frissen levágott levéldarab tömege alapján számoltuk ki, a telített súlyt (SW - ***s**aturated **w**eight*) a levéldarab 4 órás vízbemerítése után, a száraz tömeget (DW - ***d**ry **w**eight*) a levéldarab 80 ºC-on tömegállandóságig történt szárítása után határoztuk meg. A sejtnedv ozmolaritását (c) ozmométerrel (Osmomat 030-D, Gonotec, Németország) fagyáspont változás alapján határoztuk meg. A sejtnedvet egy friss vágási felületű 3 cm-es levéldarab centrifugálásával nyertük ki a növényekből Bajji *et al*. (2001) módszere szerint. A sejtnedv OP-ját (ozmotikus potenciál) a következő formula alapján számoltuk: OP (Mpa) = -c (mosmol kg^{-1}) × 2,58 × 10^{-3} (Bajji *et al.* 2001). A teljes turgoron mért ozmotikus potenciált (OP_{100}) az OP_{100} = OP × RWC egyenletből számoltuk. Az OA-t (ozmotikus adaptáció) a kontroll (OP_{100}^{c}) és stressz kezelt növények (OP_{100}^{s}) teljes turgoron mért ozmotikus potenciáljának különbségéből határoztuk meg (Kameli és Lösel 1995).

3.2.3. Az OWB populáció szülői vonalainak felnőttkori tesztje

A csíráztatott szemeket *Jiffy-7* (Jiffy International, Kristiansand, Norvégia) növénynevelő tápkockákba helyeztük és három hétig 4 ºC-on 100 µmol m^{-2} s^{-1} fényintenzitás mellett előneveltük. A növényeket ezután 4 kg tőzeg, homok és kerti föld 1:1:1 arányú keverékét tartalmazó cserepekbe (2 növény / cserép) ültettük és a növényeket PGB-36 típusú (Conviron, Manitoba, Kanada) növénynevelő kamrában neveltük tovább. A növényneveléshez a tavasz-nyár (Tischner *et al.* 1996) típusú klímaprogramot használtuk. Genotípusonként és kezelésenként hat növényt ültettünk el három-három cserépben három ismétlésben. A növényeket a kalász megjelenéséig normál vízellátottság mellett neveltük (talaj maximális vízkapacitásának 80 % -a). A kalászolást követő napon genotípusonként és ismétlésenként három-három cseréptől megvontuk a vizet és a talaj maximális vízkapacitásának 40 % -áig szárítottuk. A kezelt növényeket érésig ezen a víztartalom értéken, a kontroll növényeket ideális vízellátottság mellett neveltük. A víztartalmat a cserepek tömegének mérésével ellenőriztük és szükség esetén pótoltuk a hiányzó vízmennyiséget. 12 nappal a stressz kezelés kezdete után meghatároztuk a zászlóslevelek relatív víztartalmát. A teljes érést

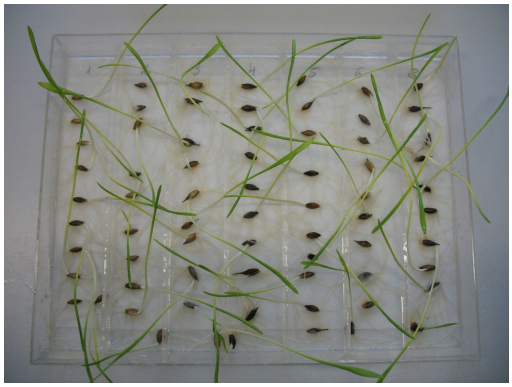
követően a növények magasságát, összтермését, ezerszemtömegét és növényenkénti kalászszámát határoztuk meg.

3.3. Az OWB populáció tesztjei

Az OWB populációt három fejlődési fázisban összesen kilenc kísérleti beállítást alkalmazva vizsgáltuk (*1-9. kísérlet*).

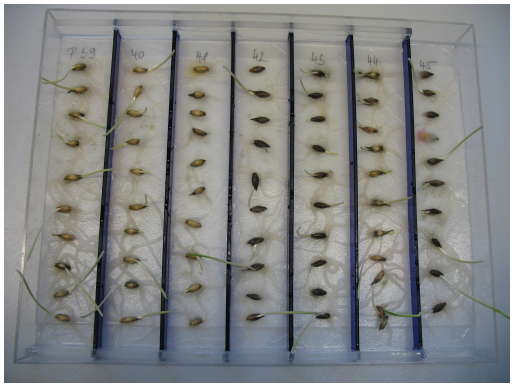
3.3.1. Az OWB populáció csíranövény tesztje (*1. kísérlet*)

A csíranövény tesztek körülményei megegyeznek a 3.2.1. fejezetben leírtakkal. Az OWB populációt eltérő időpontokban, a 2005-2006-os években hét független ismétlésben teszteltük (**2-3. kép**).



2. kép

Kontroll csíranövény teszt az OWB populáción
(2006. november, Martonvásár)



3. kép

Ozmotikus kezelés az OWB populáció csíranövény tesztje során
(2006. november, Martonvásár)

3.3.2. Az OWB populáció fiatalnövénykori tesztjei (*2.* és *3. kísérlet*)

Az OWB populáció 94 DH vonalának ozmotikus stressztűrését fiatalnövény korban a 3.2.2. fejezetben leírt kísérlettel megegyező körülmények között vizsgáltuk (*2. kísérlet*). Ebben a kísérletben a növényeket másfél liter térfogatú edényekben neveltük, amelyek egyenként három genotípust és genotípusonként 8-10 növényt tartalmaztak. A kísérletet két független ismétlésben végeztük el és csak a biomassza produkciót (hajtáshossz és hajtás száraztömeg) jelző paramétereket határoztuk meg.

Ezen kívül elvégeztük a két lépcsős PEG-es kísérlet rövidített, hét nap 15 w/v %-os PEG kezelést tartalmazó módosított változatát is (*3. kísérlet*). A populáció vonalait egy 5 liter térfogatú edényben (16 cm × 30 cm) neveltük (**4. kép**). Az edényekbe illeszkedő fém háló felületén helyeztük el a csírázó szemeket, összesen tíz genotípust, genotípusonként tíz szemet. Az OWB populáció vonalaival együtt egyéb, a dolgozatban nem szereplő genotípusokat is teszteltünk, hogy minden növénynevelő edénybe tíz genotípus kerüljön. Az edényeken belül a genotípusok elhelyezése véletlenszerűen történt. A kísérleteket temperált üvegházban (IPK, Gatersleben, Németország)

végeztük, szükség esetén kiegészítő világítással, hogy a fényintenzitás elérje a 500 μmol m^{-2} s^{-1} -et. Ezt a kísérlettípust három független ismétlésben végeztük. A kísérlet végén a kontroll és a kezelt növények hajtás száraztömegét határoztuk meg.

4. kép

Az OWB populáció fiatalnövénykori tesztje (*3. kísérlet*)
(2007. május, Gatersleben, Németország**)**

3.3.3. Az OWB populáció felnőttkori tesztjei

Az OWB populáció különböző vízhiányra adott válaszait hat különböző beállítású felnőttkori, érésig nevelt növényekkel elvégzett kísérletben teszteltük.

3.3.3.1. Fóliasátras teszt (*4. kísérlet*)

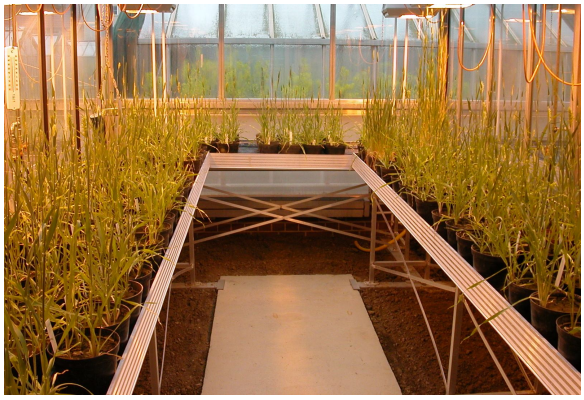
A gaterslebeni IPK kísérleti területén (Gatersleben, Németország) található 6 m × 30 m alapterületű fóliasátorban 2005 márciusában kezdtük el a kísérletet. A populáció 94 vonalát négy véletlen blokk elrendezésű parcellába vetettük el úgy, hogy két parcellában a vonalak mindegyike háromszor szerepeljen vonalanként hat-hat növénnyel (**5-6. kép**). Egy-egy parcella 7 m × 1,5 m méretű volt. A kalászok megjelenéséig minden parcellát öntöztünk. A kalászolást naponta ellenőriztük, és amikor a genotípusok 50 %-a kalászolni kezdett két parcellában abbahagytuk az öntözést. A másik két parcellát változatlanul öntöztük érésig. A normál vízellátottságú és a nem öntözött parcellapárok között 8 m pufferzóna (értékelés nélküli beültetett parcella) került kialakításra. Sajnos a vízmegvonás túl gyengének, és a talaj feltételezett víztartalékai miatt túl későinek bizonyult. A vízhiány a terméseredményekben nem okozott szignifikáns változást csak a növénymagasságot csökkentette. Emiatt ebből a kísérletből csak a növénymagasságra vonatkozó adatok kerültek feldolgozásra.

5-6. kép

Az OWB populáció fóliasátras tesztje
(2005. április és július, Gatersleben, Németország)

3.3.3.2. Üvegházi teszt (*5. kísérlet*)

Az OWB populáció üvegházi tesztjét az IPK (Gatersleben, Németország) területén található fűtetlen üvegházban végeztük (**7. kép**). A növénynevelés ideje alatt borult idő esetén kiegészítő világítást használtunk. A gabonaszemeket 2005 márciusában ültettük 2 kg kerti talajt tartalmazó cserepekbe. Egy cserépbe egy növény került. Genotípusonként nyolc növényt ültettünk és kalászolásig ideális vízellátottság mellett neveltük őket. A cserepeket genotípusonként kettesével négyismétléses véletlen blokk elrendezésben helyeztük el az üvegházban. Tíz nappal a kalászolás kezdete után a genotípusonként párba rendezett cserepek egyikén vízmegvonást alkalmaztunk. Meghatároztuk a talaj vízkapacitását, és a kezelt növényeket a talaj maximális vízkapacitásának 40 %-áig szárítottuk, majd ezen a nedvességtartalmon neveltük tovább. A locsolást a cserepek tömegének mérésével szabályoztuk. A kontroll növényeket érésig ideális vízellátottság mellett neveltük. Aratáskor a növények magasságát, össztermését és ezerszemtömegét határoztuk meg.



7. kép

Az OWB populáció üvegházi tesztje

(2005. május, Gatersleben, Németország)

3.3.3.3. Fitotron teszt (*6. kísérlet*)

Az OWB populáció fitotronos tesztjét egy PGB-36 típusú növénynevelő egységben (Conviron, Manitoba, Kanada) végeztük el (**8. kép**). A kb. 1 cm nagyságú hajtással rendelkező csíráztatott szemeket *Jiffy-7* (Jiffy International, Kristiansand, Norvégia) növénynevelő tápkockákba helyeztük és három hétig 4 ºC-on 100 µmol m^{-2} s^{-1} fényintenzitás mellett előneveltük. Ezt követően a növényeket egyesével 2 kg tőzeg, homok és kerti föld 1:1:1 arányú keverékét tartalmazó cserepekbe ültettük, és növénynevelő kamrában neveltük tovább. Egy genotípusból tíz növényt vizsgáltunk, és az üvegházas kísérlethez hasonlóan párosával, ötismétléses random blokk elrendezésben helyeztük el a cserepeket a fitotronban. A cserépbe ültetett növényeket két hétig 18/14 °C, két hétig 20/16 °C majd 22/20 °C-on neveltük. Minden növényt a kalász megjelenéséig normál vízellátottság mellett neveltük. A szárazságstresszt a kalász megjelenését követő 5. napon kezdtük. Ekkor a kezelt növények öntözését abbahagytuk addig, amíg a talaj térfogategységre vonatkoztatott víztartalma (VSMC - ***v**olumetric **s**oil **m**oisture **c**ontent*) 7,0 ± 0,5 % -ra csökkent. Ez 4-5 nap alatt történt meg. A kezelt növényeket érésig ilyen víztartalom mellett neveltük. A talajnedvességet mindig azonos időben naponta monitoroztuk SM-200 típusú (Delta-T Devices, Cambridge, Egyesült Királyság) talajnedvesség-mérővel. A kontroll növények talajnedvesség tartalma 20,0 ± 5,0 VSMC % volt. Hét nappal a vízmegvonás kezdete után mintát vettünk a zászlóslevélből az RWC és az ozmotikus paraméterek meghatározásához. A kísérlet során felvételeztük a virágzási időt, majd a teljes érést követően a növénymagasságot, a termést és az ezerszemtömeget határoztuk meg.

8. kép
Az OWB populáció fitotroni tesztje
(2006. március, Martonvásár, Fitotron)

3.3.3.4. Kontrollált vízellátású szántóföldi tesztrendszer (*7. kísérlet*)

Martonvásáron 2007-ben készült el egy elhúzható esővédő fóliatetővel rendelkező kísérleti terület (**9. kép**). A fóliatető csak eső esetén tartózkodik a parcellák fölött, így a csapadékkizárás ellenére minimálisra csökkenthető a fedettséggel járó negatív hatás (túlmelegedés, magas

páratartalom). Irodalmi adatok alapján ez a kísérleti rendszer alkalmas legjobban természetszerű, de mégis kontrollálható vízhiány előidézésére. A területre jutó vízmennyiséget automata csepegtető öntözőrendszer szabályozza (Irritrol Junior Max, The Torro Company, Lyndal, USA). A fóliasátor alatt található hat kísérleti parcella (3,4 m × 5 m) egyedileg öntözhető. Az egyes parcellák 1,5 m mélységig vízzáró fóliával vannak körülvéve, ami megakadályozza a csapadékvíz oldalirányú beszivárgását. Talajtani vizsgálatok – próbafúrások – eredménye alapján a terület alatt egy ősi patakmeder kavicsos medre akadályozza meg a mélyen elhelyezkedő talajvíz kapilláris elven történő feláramlását. A talaj nedvességtartalmát 10, 20, 30, 40, 60 és 100 cm mélységben tudjuk nyomon követni a parcellánként két pozícióban elhelyezett PP2 típusú (Delta-T Device, Cambridge, Egyesült Királyság) talajnedvesség-mérővel. A hat kísérleti parcellából háromnál normál öntözéssel ideális vízellátottságot, három parcellán pedig szárazságstresszt idéztünk elő.

Az OWB populációt 2007 márciusában vetettük el a kísérleti parcellákba. Egy genotípusból 6 szemet vetettünk parcellánként, 15 cm sorttávolsággal, soronként négy genotípussal. Mindkét vízellátottságon (100 % csírázás esetén) genotípusonként három ismétlésben 6 növényt tudtunk nevelni. A tavaszi árpánál szokásos növényvédelmi intézkedéseket és a gyomirtást vegyszerrel végeztük. Kalászolásáig a parcellák talajnedvessége 21-23 VSMC % volt, majd amikor a genotípusok 50 %-a kalászolni kezdett három parcellánál az öntözést megszüntettük. Aratáskor a kezelt parcellák nedvességtartalma 10 cm mélységben 6 VSMC % a kontroll parcelláké 28 VSMC % volt. Aratáskor a tőszámot, növénymagasságot, növényenkénti termést és az ezerszemtömeget határoztuk meg.

9. kép

A kontrollált vízellátású és a természetes csapadékellátottságú szántóföldi tesztrendszer

(2007. június, Martonvásár)

3.3.3.5. Szántóföldi kísérlet (*8. kísérlet*)

2007-ben a kontrollált vízellátású szántóföldi kísérlet mellett beállítottunk egy háromismétléses random blokk elrendezésű szántóföldi kísérletet is. A blokkok méretei, a növények elrendezése és a kísérlet körülményei - a vízellátás kivételével - megegyezett a *7. kísérlet*ben leírtakkal. A talaj nedvességtartalma 10 cm-es mélységben vetéskor 17 VSMC %, aratáskor 8

VSMC % volt. A kísérleti terület mellett található meteorológiai állomás adatai alapján a vegetációs periódusban 75 mm csapadék hullott. A tíz éves csapadékátlagok alapján (160,5 mm) ezt a kísérleti környezetet szántóföldi szárazságstresszként értékeltük.

3.3.3.6. Kémiai deszikkáció szántóföldön (*9. kísérlet*)

Az OWB populáció kémiai deszikkációs tesztjét az IPK (Gatersleben, Németország) kísérleti területén hajtottuk végre 2006-ban. Minden genotípust négy, 1 m hosszú sorba vetettük el 20 cm-es sortávolsággal. 14 nappal a kalászolást követően genotípusonként két sort KI (0,5 w/w %) vizes oldatával permeteztük le, amely a levélfelülettel érintkezve perzselést okoz. A fotoszintetizáló szövetek károsodása miatt a szemtelítődés elsősorban a szárban raktározott tápanyagok felhasználásával történhet meg. A deszikkált és a kontroll növények főkalászának termését aratás és cséplés után határoztuk meg.

10. kép

A kémiai desszikkáció
(2008. május, Gatersleben, Németország)

3.4. Az árpagyűjtemény tesztje

Az árpagyűjtemény vizsgálatát csíranövény tesztben és fiatalnövény tesztben az *1. és 3. kísérlet*tel megegyezően, a 3.2.1. és a 3.3.2. fejezetekben leírt módon két-két független ismétlésben végeztük el. Felnőtt korban egy szántóföldi kémiai deszikkálási tesztet is elvégeztünk két független ismétlésben. Kísérlet elrendezése megegyezett a 3.3.3.6. fejezetben leírtakkal, de a KI koncentrációja 1,5 % volt, a permetezést pedig a kalászolást követő 10. napon végeztük. Az OWB populáció és az árpagyűjtemény kémiai deszikkációs kezelése során használt kálium-jodid koncentrációja azért különbözött egymástól, mert az előkísérlet során az árpagyűjtemény toleránsabbnak mutatkozott, és az OWB populációnál alkalmazott koncentráció még nem okozott szignifikáns hatást.

3.5. EST homológia keresés

Az OWB populáció része volt annak a három térképezési populációt magába foglaló vizsgálatnak, amelynek eredményeképpen elkészült egy részletes, EST alapú árpa konszenzus térkép (Stein *et al.* 2007). Ez lehetővé tette, hogy az általunk azonosított szárazságtűréssel kapcsolatba hozható lókuszokban található EST szekvenciák segítségével a QTL hatást okozó gének feltételezett funkcióját is meghatározzuk. A több jelleget befolyásoló és legalább két fejlődési fázisban is azonosított QTL-ek csúcsrégiójába eső EST markerek szekvenciáit fehérje alapú homológia összehasonlításnak vetettük alá. Az EST markerhez tartozó szekvenciát a GrainGenes adatbázisból (http://wheat.pw.usda.gov) töltöttük le. Az összerendezett egy lókuszhoz tartozó EST-k konszenzus szekvenciáit (*unigene*) az NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) és a HarvEST (http://www.harvest-web.org, barley, 1.72 #35) adatbázisokból töltöttük le. A fehérje alapú összehasonlítást BLASTX 2.2.19 program segítségével az NCBI *non redundant* adatbázissal szemben végeztük. A program előnye, hogy a kódoló régiót tartalmazó nukleotid szekvencia transzláltatott termékét hasonlítja össze a fehérje adatbázissal, amely a nukleotid alapú összehasonlításnál érzékenyebb. A szekvencia feltételezett funkcióját a legjobb egyezést mutató rizs ortológ alapján valószínűsítettük.

3.6. Marker analízis

Az árpagyűjtemény genotípusaiból teljes genomi DNS-t izoláltunk Plaschke *et al.* (1995) módszere szerint (Melléklet, M2). A mikroszatellit markerek primer szekvenciáit a GrainGenes adatbázisból (http://wheat.pw.usda.gov) töltöttük le és a polimeráz láncreakciót (PCR) Röder *et al.* (1993) módszere szerint végeztük (Melléklet, M3). A PCR termékek méretét a QIAxcel system (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) fragmentanalizáló készülékkel határoztuk meg a gyártó utasításait követve. A készülékkel az elválasztás kapilláris gélelektroforézis elvén történik. Gyári adatok alapján az elválasztható legkisebb fragmentkülönbség 3 bp. A genotipizálást több ismétlésben is elvégeztük a QIAxcel készülékkel, illetve ALF Express II (Amersham Bioscience) készülékkel való méréssel is megerősítettük.

3.7. Statisztikai analízis

A fenotípusos adatok variancia analízisét és a korrelációs számításokat az SPSS 16.0 statisztikai programmal végeztük. A korrigált átlagok (*adjusted mean* vagy *estimated marginal mean*) kiszámításához lineáris véletlen/vegyes hatás modellt használtunk (LMM - ***l****inear* ***m****ixed* ***m****odel*) amiben a genotípusokat fix, az ismétléseket pedig random hatásnak tekintettük.

A kezelt és kontroll körülmények között mért paraméterek hányadosából minden jellegre tolerancia indexet (TI) számoltunk. Az adott fenotípusos jellegre vonatkozó TI-ket, mint a tolerancia mértékét jelző paramétert térképeztük.

A QTL analízishez elsődlegesen a QTLNetwork V2.0 programot (Yang és Zhu 2005) használtuk, amely a vegyes modellen alapuló összetett intervallum térképezés módszerét (MCIM - ***m**ixed-model based **c**omposite **i**nterval **m**apping*) alkalmazza. Ez a program alkalmas több környezetben elvégzett ismételt kísérletek adatainak együttes értékélésére, valamint becslést ad a QTL × környezett kölcsönhatásokra és a szűkebb értelemben vett örökíthetőségre (*narrow-sense heritability*). Az empirikus szignifikanciaszintek meghatározásához 1000 ismétléses permutációs tesztet használtunk ($P \leq 0,05$). A kritikus F-érték helyett az adott QTL-hez tartozó pontos P-értéket adtuk meg az egyes szignifikáns lókuszoknál. A QTL analízist a fenotípusos adatok ismétlésenkénti átlagértékeivel végeztük, melyeket kísérlettípustól függően 3-12 növény átlagából számoltunk ki. A különböző fejlődési fázisokat külön, az ismétléseket egy analízisben elemeztük. A felnőtt korban elvégzett különböző kísérleteket eltérő könyezetként vettük figyelembe. Egyedül a hajtáshossz volt az a jelleg, amelyet mind a három fejlődési fázisban vizsgáltunk. Ezeket az adatokat fejlődési fázisonként külön és együtt (a fejlődési fázis mint, környezet) is elemeztük.

A QTL-ek elnevezését Szűcs *et al.* (2009) javaslatai alapján készítettük. A QTL neve tartalmazza a hozzá kapcsolható jelleg és a populáció rövidítését, valamint a kromoszómaszámot.

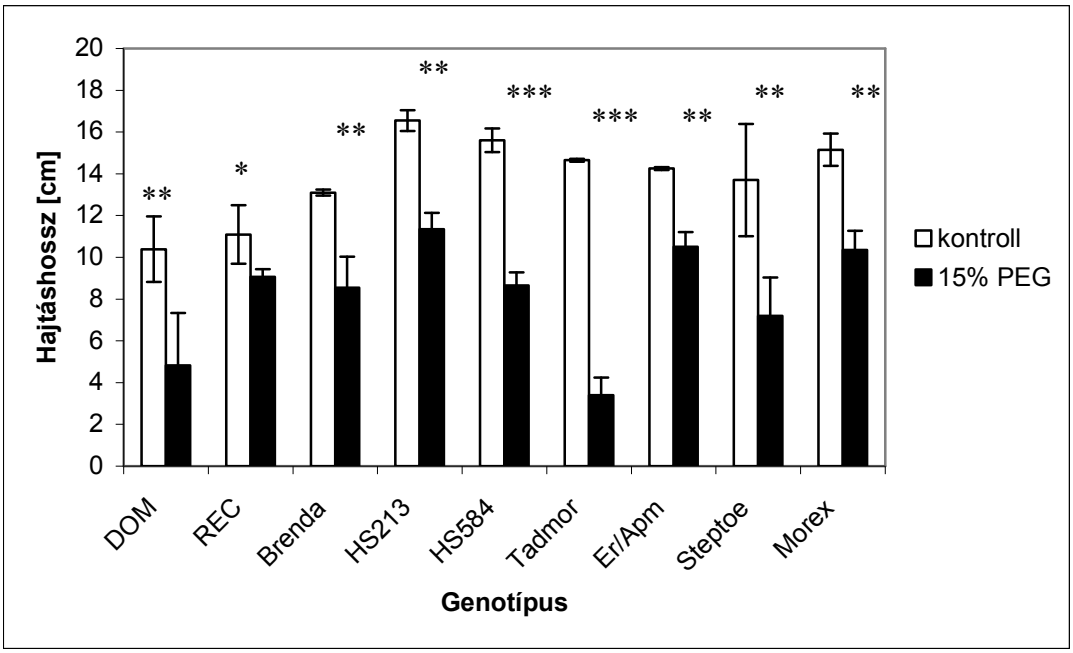
Az irodalomban eddig leírt és az általunk azonosított szárazságtűréshez kapcsolható főbb árpa QTL-ek összevetéséhez a Marcel *et al.* (2007) által készített konszenzus térképet használtuk. Ez a konszenzus térkép azért került kiválasztásra, mert a vizsgált populációk legtöbb közös markerét tartalmazza. A ‘Tadmor’ × ‘Er/Apm’ és a ‘Steptoe’× ‘Morex’ populációkon azonosított QTL-ek adatait a GrainGenes ’Cmap’ funkcióját használva vetettük össze. Az összehasonlító ábrán szereplő bin pozíciók a Barley Genomics oldalon található adatok alapján kerültek ábrázolásra (http://barleygenomics.wsu.edu/all-chr.pdf).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A térképezési populáció kiválasztása

4.1.1. Szülői vonalak csíranövény tesztje

Az öt térképezési populáció szülői vonalainak ozmotikus stressztűrését elsőként csíranövény tesztekben vizsgáltuk. A PEG kezelés minden genotípus esetében a kontrollhoz viszonyítva hajtáshossz csökkenést idézett elő (**5. ábra**). Kontroll körülmények között a leghosszabb hajtást a két vadárpánál ('HS213', 'HS584') mértük, ozmotikus stressz alatt a 'HS584' hajtáshossza azonban nagyobb mértékben csökkent. A legkisebb hajtáshosszt a 'DOM' és 'Tadmor' genotípusok esetében mértük ozmotikus stressz alatt.



*, **, *** Szignifikáns P ≤ 0,05, 0,01, 0,01 szinten

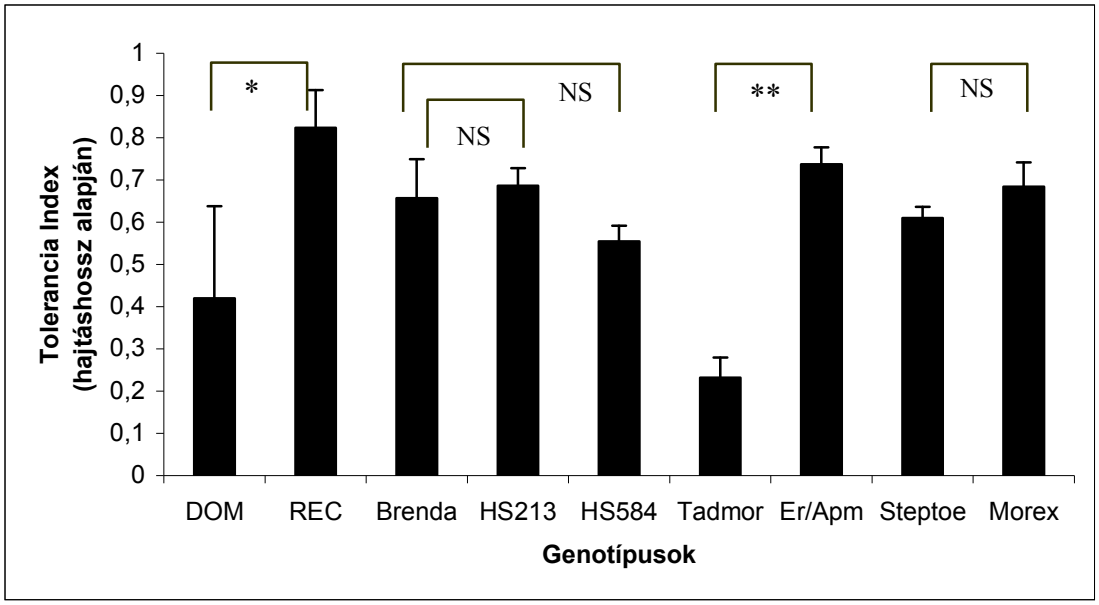
5. ábra.

Szülői vonalak csíranövénykori hajtáshossz értékei kontroll körülmények között és ozmotikus stressz hatására

A hajtáshosszból számított tolerancia index (TI) nagy különbséget mutatott az egyes genotípusok között. A legalacsonyabb tolerancia indexszel a 'Tadmor' (0,23) rendelkezett a legtoleránsabbnak pedig a 'REC' (0,82) mutatkozott (TI=1 abszolút toleráns, TI=0 abszolút szenzitív).

Ebben a fejlődési fázisban a gyökérhosszak mérete erős korrelációt mutatott a hajtáshossz értékekkel (kontroll hajtáshossz és kontroll gyökérhossz: r=0,82 kezelt hajtáshossz és kezelt gyökérhossz: r=0,77 tolerancia index hajtáshossz és tolerancia index gyökérhossz: r=0,83 szignifikáns P ≤ 0,01 szinten), így ezek részletesen nem kerülnek bemutatásra.

A térképezési populációk szülői vonalainak egymáshoz viszonyított összehasonlításakor a ‘DOM’ és ‘REC’, valamit a ‘Tadmor’ és az ‘Er/Apm’ genotípusok között találtunk szignifikáns különbséget (**6. ábra**).



*, ** Szignifikáns P ≤ 0,1, 0,05 szinten, NS: nem szignifikáns

6. ábra.

Szülői vonalak ozmotikus toleranciája csíranövénykorban ozmotikus stressz (15 % PEG kezelés) hatására

4.1.2. Szülői vonalak fiatalnövénykori tesztje

A szülői vonalak kétlépcsős ozmotikus kezelést alkalmazó kísérletében a növények részletes vizsgálatát a 18 % PEG kezelését követően végeztük el (**2. táblázat**). Az ozmotikus stressz alatt a növények hajtáshossz növekedése és a biomassza gyarapodása a kontrollhoz viszonyítva jelentősen lassult. A kilenc genotípus közül a ‘Steptoe’ rendelkezett a legnagyobb hajtáshosszal és hajtás száraztömeggel a kezelést követően, a tolerancia index azonban a ‘DOM’ genotípus esetében volt a legnagyobb. Feltételezéseink szerint ez annak köszönhető, hogy a kontroll körülmények között nagyobb növények hajtáshossza és száraztömege stressz körülmények között nagyobb mértékben csökken és így a tolerancia index alacsonyabb. A kisebb tolerancia index emiatt nem zárja ki azt, hogy az alacsonyabb TI-vel rendelkező genotípus abszolút értékben nagyobb biomasszával rendelkezik, mint „toleránsabb” társa.

A növények relatív víztartalmát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy ozmotikus stressz hatására a ‘Morex’ és az ‘Er/Apm’ relatív víztartalma csökkent a legkifejezettebben, míg a ‘DOM’ és a ‘REC’genotípus esetében csak mérsékeltebben. A legnagyobb ozmotikus adaptációs képességet (OA) az ‘Er/Apm’ genotípusnál figyeltük meg. A ‘Morex ’ genotípus esetében a növényi minták károsodása miatt az OP S -t és ezáltal az OA -t sajnos nem tudtuk meghatározni.

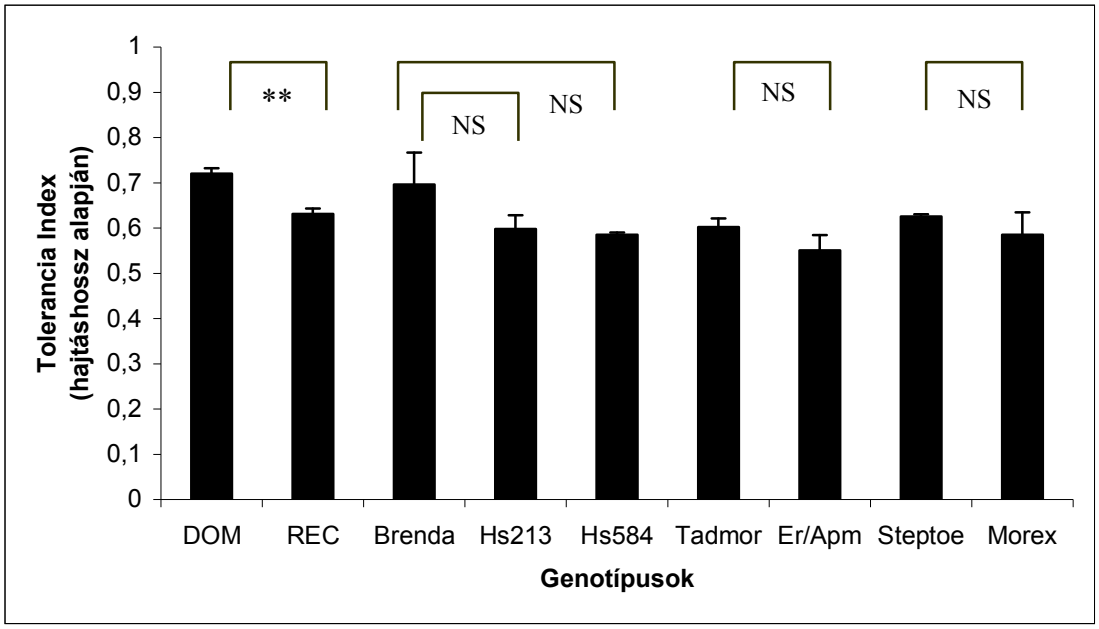
A térképezési populációk szülői vonalainak egymáshoz viszonyított összehasonlításakor a hajtáshossz tolerancia indexei alapján a 'DOM' és 'REC' között találtunk egyedül szignifikáns különbséget (**7. ábra**). A száraztömeg értékek hasonló tendenciát mutattak, ezért nem kerültek bemutatásra.

2. táblázat. Szülői vonalak fenotípusos adatai 3 hetes korban, vízkultúrás kísérleti rendszerben, 18 %-os PEG kezelést követően

SL: hajtáshossz (*shoot length*), DW: hajtás száraztömeg (*dry weight*), RWC: relatív víztartalom (*relative water content*), OP: ozmotikus potenciál (*osmotic potential*), OA: ozmotikus adaptáció (*osmotic adjustment*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*)

Genotípus	SL C [cm]	SL S [cm]	DW C [g/növény]	DW S [g/növény]	RWC C [%]	RWC S [%]	OP C [MPa]	OP S [MPa]	OA [Mpa]
DOM	24,1± *1,0*	18,1 ±*1,0**	0,22± *0,04*	0,08± *0,01**	95,44± *0,87*	87,93± *4,51*	-1,52± *0,14*	-2,05± *0,08****	0,38
REC	27,7± *2,3*	18,3± *1,1**	0,36± *0,06*	0,10± *0,01**	96,46± *1,68*	88,98± *2,50****	-1,62± *0,08*	-2,21± *0,44*	0,46
Steptoe	32,5± *0,2*	20,3± *0,0****	0,50± *0,01*	0,16± *0,01***	96,31± *1,19*	87,09± *2,22****	-1,74± *0,47*	-1,73± *0,17*	-0,30
Morex	28,7± *1,6*	17,1± *0,5***	0,44± *0,03*	0,12± *0,01***	96,03± *1,33*	79,91± *2,41****	-1,78± *0,34*	-	-
Brenda	28,7± *1,2*	20,0± *1,2**	0,39± *0,09*	0,13± *0,01**	94,59± *1,17*	89,58± *1,32**	-1,83± *0,15*	-1,76± *0,09*	-0,44
HS213	27,3± *0,5*	16,3± *1,1***	0,39± *0,03*	0,14± *0,01***	98,00± *1,45*	91,09± *3,79**	-1,41± *0,14*	-1,70± *0,10***	0,05
HS584	28,1± *0,4*	16,4± *0,4***	0,45± *0,04*	0,11± *0,00**	95,66± *0,61*	85,19± *1,64****	-1,86± *0,06*	-2,18± *0,25***	0,02
Tadmor	28,3± *1,1*	17,9± *1,2**	0,44± *0,07*	0,14± *0,03**	97,54± *1,76*	94,92± *2,63*	-1,47± *0,13*	-1,79± *0,16***	0,15
Er/Apm	34,7± *1,7*	19,1± *2,1**	0,41± *0,04*	0,11± *0,01**	94,42± *2,31*	74,66± *3,43****	-1,61± *0,09*	-3,01± *0,53****	0,77

*, **, ***, **** Szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01, 0,001, 0,0001 szinten



** Szignifikáns P ≤ 0,05 szinten, NS: nem szignifikáns

7. ábra.

Szülői vonalak ozmotikus toleranciája 3 hetes korban, vízkultúrás kísérleti rendszerben, 18 %-os PEG kezelés hatására

Figyelembe véve a csíranövény és a fiatalnövény teszt eredményeit, valamint a populációkra vonatkozó genetikai térképek elérhetőségét a 'DOM' és a 'REC' keresztezéséből származó OWB populációt találtuk legalkalmasabbnak a további térképezési vizsgálatokra.

4.1.3. Az OWB populáció szülői vonalainak felnőttkori vizsgálata

Az OWB populáció vizsgálatát megelőzően a szülői vonalak felnőttkori toleranciájáról is szerettünk volna információt szerezni, így a korai fejlődési fázisokat követően elvégeztük a két vonal felnőttkori vizsgálatát.

A 'DOM' és a 'REC' fenotípusa jelentősen különbözik egymástól: az előbbi genotípus zömökebb, kisebb kalászú, de jobban bokrosodó, míg a 'REC' nagyobb termetű, kevésbé bokrosodó és nagyobb kalászú (**3. táblázat**). A virágzást követően kezdett szárazságstressz mindkét genotípus esetében szignifikáns terméscsökkenést idézett elő, azonban a 'DOM' genotípus valamivel nagyobb termést hozott. Az ezerszem tömeg csak a 'REC' esetében csökkent szignifikánsan. A két genotípus virágzási ideje között 11 nap különbséget találtunk.

3. táblázat. Az OWB populáció szülői vonalainak fenotípusos jellemzői felnőtt korban virágzást követő vízelvonás és kontroll körülmények között

SL: hajtáshossz (*shoot length*), TGW: ezerszemtömeg (*thousand grain weight*), NGPE: kalászonkénti szemszám (*number of grain per ear*), NEPP: növényenkénti kalászszám (*number of ear per plant*), RWC: relatív víztartalom (*relative water content*)

	DOM		REC	
Jelleg	Kontroll	Kezelt	Kontroll	Kezelt
SL [cm]	58,00±1,32	47,08±0,68***	70,75±3,73	62,08±2,09*
Termés [g]	4,87±0,31	0,92±0,03**	4,55±0,28	0,29±0,08***
Virágzási idő [nap]	71 ±2		82± 1***	
TGW [g]	26,96±1,62	23,07±4,32	22,15±1,60	8,46±1,95***
NGPE	20±2	16±3	45±5	17±5**
NEPP	8±0	3±0***	5±1	2±1
RWC [%]	92±4	67±2***	88±2	24±8***

*, **, ***, **** Szignifikáns P ≤ 0,05, 0,01, 0,001, 0,0001 szinten

4.2. Csíranövény tesztek az OWB populáción

4.2.1. Az OWB populáció csíranövénykori fenotípusos jellemzői

Az OWB populáció vonalait csíranövénykorban hét független ismétlésben teszteltük (*1. kísérlet*). A kezelés szignifikánsan csökkentette a hajtás és gyökérhossz növekedést, de ennek mértéke az egyes vonalakban jelentős különbségeket mutatott: a legkisebb és a legnagyobb genotípusok között a hajtás és gyökérhossz esetében egyaránt 10 cm-nél is nagyobb különbéget találtunk (**4. táblázat**).

Érdekes módon a csíranövény tesztekben mért hajtáshossz fenotípusos varianciáját (V_P) a genetikai tényezők (V_G) jóval nagyobb arányban befolyásolják, mint kontroll körülmények között. A gyökérhossz esetében ilyen különbséget nem találtunk (**4. táblázat**).

4. táblázat. Az OWB populáció 94 DH vonalának hajtás és gyökérhossz adatai, valamint a fenotípusos variancia értékei a csíranövény tesztekben kontroll körülmények között és ozmotikus stressz (15 % PEG) hatására

SL: hajtáshossz (*shoot length*), RL: gyökérhossz (*root length*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*), V_G/V_P: a genetikai eredetű fenotípusos variancia és a teljes fenotípusos variancia hányadosa

Jelleg	Korrigált átlag ± SE	Min	Max	V_G/V_P
SL C [cm]	10,4±0,6	4,8	16,2	0,14
SL S [cm]	5,8± 0,7***	0,7	12,2	0,41
SL TI	0,54 ±0,04	0,07	0,95	0,22
RL C [cm]	12,6 ±0,9	4,3	19,3	0,17
RL S [cm]	6,1± 0,5**	0,9	17,1	0,17
RL TI	0,55± 0,05	0,09	1,05	0,26

***Szignifikáns P ≤ 0,001 szinten

4.2.2. Az OWB populáción csíranövénykorban azonosított lókuszok

Csíranövénykorban hat különböző jelleget vizsgáltunk: kontroll hajtáshossz, kezelt hajtáshossz, hajtáshossz tolerancia index, kontroll gyökérhossz, kezelt gyökérhossz és gyökérhossz tolerancia index. Ebben a fejlődési fázisban minden jelleget figyelembe véve összesen nyolc QTL-t azonosítottunk, amelyek négy különböző lókuszban helyezkednek el (**5. táblázat**). Jellegenként általában egy, két esetben pedig kettő QTL-t találtunk, melyek a 2H, 5H és a 7H kromoszómákon foglalnak helyet. Az 5H kromoszómán egy stressz specifikus lókuszban három egymáshoz közeli QTL-t azonosítottunk, amely a toleranciát (QTL-3, QTL-5) és az ozmotikus stressz alatti hajtáshosszt (QTL-4) befolyásolja. Ezen kívül a 2H kromoszómán egy gyökértoleranciát befolyásoló (QTL-1) és a kontroll körülmények között mért hajtáshossz növekedést befolyásoló QTL-t (QTL-2) azonosítottunk. Ez a két lókusz szintén átfed egymással. A három további általunk azonosított QTL a 7H kromoszómán helyezkedik el, két lókuszban, egymástól kb. 20 cM távolságra. A csíranövénykorban azonosított QTL-ek közül a legnagyobb additív hatással és örökíthetőséggel a QTL-4 rendelkezik.

5. táblázat. Az OWB populáción csíranövénykorban azonosított hajtás és gyökérhosszt, valamint a toleranciát befolyásoló QTL-ek pozíciója, additív hatása és örökíthetősége

Kr: kromoszóma, A.E.: additív hatás (*additive effect*), h^2: szűkebb értelemben vett örökíthetőség (*narrow-sense heritability*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), RL: gyökérhossz (*root length*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*)

QTL No.	Kr.	Jelleg		QTL csúcs (cM)	QTL tartomány	A.E.	P-érték	h^2
1.	2H	RL	TI	144,7	137,4-157,3	-0,06	0,00010****	0,12
2.	2H	SL	C	155,0	150,1-157,0	-1,13	0,00010****	0,14
3.	5H	RL	TI	63,5	50,5-65,9	0,06	0,00004****	0,14
4.	5H	SL	S	69,9	66,8-79,5	0,83	0,00000****	0,23
5.	5H	SL	TI	69,9	66,8-77,5	0,08	0,00000****	0,22
6.	7H	RL	C	57,0	51,4-63,3	-1,40	0,00002****	0,17
7.	7H	RL	S	58,0	51,4-64,2	-0,93	0,00001****	0,17
8.	7H	SL	S	75,3	72,8-81,8	-0,79	0,00000****	0,21

**** Szignifikáns $P \leq 0,0001$ szinten

4.3. Fiatalnövénykori tesztek az OWB populáción

4.3.1. Az OWB populáció fiatalnövénykori fenotípusos jellemzői

Az OWB populáció vonalait fiatalnövény korban kétféle kísérletben vizsgáltuk (*2. kísérlet*: 7 nap nevelés, 7 nap 15 %-os PEG kezelés, *3. kísérlet*: 7 nap nevelés, 7 nap 15 %-os PEG és 7 nap 18 %-os PEG kezelés). Ebben az életszakaszban kontroll körülmények között intenzív növekedést figyelhettünk meg. A két különböző időtartamú független kísérlet (*2.* és *3. kísérlet)* kontroll adatait összevetve azt találtuk, hogy a növények a harmadik héten átlagosan 1,5-szeresére növelték száraztömegüket az egy héttel korábban mért értékekhez képest. Az erősebb ozmotikus kezelés

hatására (18 %-os PEG) a száraztömeg értékekből számított populáció átlagok alacsonyabbak voltak, mint az egy héttel korábban mért 15 %-os kezelést követően (**6. A táblázat**). A két különböző erősségű kezelés során mért adatok különböző kísérletből származnak, de ezt az eltérést feltehetően a hosszabb ideig tartó stressz kezelés okozhatta. Általánosságban elmondható, hogy a tápoldathoz adott 18 % PEG erős ozmotikus stresszt okozott és ilyen körülmények között a növények egyáltalán nem vagy csak csekély mértékben voltak képesek növekedésre.

A fiatalnövény korban elvégzett két kísérleti beállítást a QTL analízis során külön környezetként vettük figyelembe, így a genetikai eredetű fenotípusos variancia mellett a környezeti eredetű varianciát is meg tudtuk becsülni (**6. B táblázat**). A környezetre visszavezethető fenotípusos variancia aránya minden esetben jelentősen meghaladja a genetikai eredetű varianciát. A jellegek megnyilvánulása tehát erősen függ a környezeti tényezőktől, ami megnehezíti az eredmények eltérő környezetben való felhasználhatóságát.

6. táblázat. Az OWB populáció 94 DH vonalának száraztömege, hajtáshossza (A) és fenotípusos varianciája (B) a fiatalnövény tesztekben

DW: hajtás száraztömeg (*dry weight*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*), V_G/V_P: a genetikai eredetű fenotípusos variancia és a teljes fenotípusos variancia hányadosa, V_E/V_P: a környezeti eredetű fenotípusos variancia és a teljes fenotípusos variancia hányadosa, $V_{G\times E}/V_P$: a genetikai és a környezeti eredetű fenotípusos variancia kölcsönhatásából származó és a teljes fenotípusos variancia hányadosa

A

	Jelleg	Korrigált átlag ± SE	Min	Max
2. kísérlet	SL C [cm]	27,2 ± 5,4	15,8	40,0
	SL S (15 % PEG) [cm]	16,0± 0,7***	9,86	21,2
	SL TI	0,61 ± 0,09	0,34	0,96
	DW C [mg/ növény]	118,21 ± 20,25	52,78	270,37
	DW S (18 % PEG) [mg/ növény]	47,84±2,27***	23,82	100,50
	DW TI	0,43±0,04	0,18	0,91
3. kísérlet	DW C [mg/növény]	80,46 ± 1,29	42,64	131,77
	DW S (15 % PEG) [mg/ növény]	64,54 ± 1,50***	31,38	109,02
	DW TI	0,81±0,01	0,29	0,96

***Szignifikáns $P \leq 0,001$ szinten

B

Jelleg	V_G/V_P	V_E/V_P	$V_{G\times E}/V_P$
SL C	0,07	0,19	0,02
SL S	0,07	0,13	0,02
SL TI	0,03	0,26	0,03
DW C	0,02	0,41	0,02
DW S	0,02	0,11	0,09
DW TI	0,01	0,46	0,02

4.3.2. Az OWB populáción fiatalnövény korban azonosított lókuszok

Fiatalnövény korban a QTL analízist hajtáshossz és hajtás száraztömeg esetében mért adatokon, valamint a jellegekre vonatkozó tolerancia indexekkel végeztük el. Összesen 7 QTL-t tudtunk azonosítani, amelyek négy lókuszban helyezkednek el (**7. táblázat**). A hajtás száraztömeg kivételével jellegenként egy-egy szignifikáns QTL-t tudtunk azonosítani. Az ozmotikus stressz alatt a száraztömeget az 5H (QTL-9) és a 7H (QTL-12) kromoszómákon található QTL-ek befolyásolják. Ez az 5H kromoszómán található lókusz egybeesik a csíranövény korban azonosított stressz specifikus régióval (QTL-3, QTL-4, QTL-5). A 7H-án található QTL pedig a fiatalnövény korban azonosított legnagyobb additív hatással rendelkező és a száraztömeget kontroll körülmények között befolyásoló QTL (QTL-13) közelében helyezkedik el. Ebben a fejlődési fázisban az additív hatással rendelkező allélok mindkét szülői vonaltól származhattak.

7. táblázat. Az OWB populáción fiatalnövény korban azonosított QTL-ek

Kr: kromoszóma, A.E.: additív hatás (*additive effect*), h^2: szűkebb értelemben vett örökíthetőség (*narrow-sense heritability*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), DW: hajtás száraztömeg (*dry weight*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*)

QTL No.	Kr.	Jelleg		QTL csúcs (cM)	QTL tartomány	A.E.	P-érték	h^2
9.	5H	DW	S	69,8	65,9-74,5	2,02	0,01480*	0,01
10.	5H	DW	TI	69,9	65,9-76,5	0,03	0,0030**	0,01
11.	6H	SL	TI	123,9	116,9-133,9	0,04	0,00001****	0,03
12.	7H	DW	S	76,3	74,3-79,0	-2,09	0,01140*	0,01
13.	7H	DW	C	79,9	79,5-80,9	-7,78	0,00002***	0,02
14.	7H	SL	C	81,8	77,0-86,8	-2,36	0,00000****	0,07
15.	7H	SL	S	84,8	78,0-92,8	-1,34	0,00000****	0,07

*, **, ***, **** Szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01, 0,001, 0,0001 szinten

4.4. Felnőttkori tesztek az OWB populáción

4.4.1. Az OWB populáció felnőttkori fenotípusos jellemzői

Az OWB populáció vonalainak szárazságtűrését összesen hat különböző beállítású felnőttkori tesztben vizsgáltuk. A korai fejlődési fázisoktól eltérően, a felnőtt korban alkalmazott szárazságstressz nem okozott minden jelleg esetében szignifikáns csökkenést (**8. A táblázat**). A fóliasátras kísérlet (*4. kísérlet*) során az alkalmazott stressz túl gyengének bizonyult és nem okozott szignifikáns változást a termésparaméterekben, ezért ebből a kísérletből csak a hajtáshossz adatok kerültek feldolgozásra. Ezzel ellentétben az üvegházas (*5. kísérlet*) kísérletben a vízelvonás a hajtáshosszt nem, azonban a termést és az ezerszemtömeget szignifikánsan csökkentette. Ezt feltehetően a tavasz végi-nyár eleji túl meleg üvegházi nevelési körülmények okozták, amely a kontroll növények hajtáshossz növekedését az ideális vízellátottság ellenére is visszavetették. A fitotronos (*6. kísérlet*) kísérletben stressz hatására a populáció termésátlagában megfigyelt szignifikáns csökkenés ellenére az ezerszem-tömeg nem mutatott változást, amíg az esősátras (*7.*

kísérlet) kísérletben ennek ellenkezőjét tapasztaltuk. Feltételezéseink szerint ennek az az oka, hogy a cserépben történő növénynevelés során a fertilis hajtások száma általában alacsony (gyakran csak 2-3) és egy erős, virágzást követő stressz a kalászonként kifejlődő kis szemszám miatt okoz terméscsökkenést. Nagyon alacsony szemszám esetén a kifejlődött szemek telítődése azonban normális maradhat és ennek következtében az ezerszemtömeg nem jelzi a stressz által okozott negatív hatást. Szántóföldi körülmények között ezzel szemben a növények jobban bokrosodnak és egy gyengébb késői vízhiány a termés helyett elsősorban az ezerszemtömeget befolyásolja, ha a további bokrosodás nem korlátozott (pl.: magas hőmérséklet által).

A felnőtt korban meghatározott jellegek fenotípusos varianciáját a fiatalnövénykori eredményekhez hasonlóan legnagyobb részben a környezeti eredetű variancia befolyásolta és a genetikai faktorok csak 3-16%-ban járultak hozzá a populációban megfigyelhető teljes fenotípusos varianciához (**8. B táblázat**).

A fitotronban végzett kísérlet során (*6. kísérlet*) azt tapasztaltuk, hogy a vízelvonás szignifikánsan csökkentette a növények víztartalmát, valamint ozmotikus potenciálját, azonban ennek a mértéke az egyes genotípusok között nagy különbségeket mutatott (**9. táblázat).**

8. táblázat. Az OWB populáció fenotípusos átlagértékei (A) és a fenotípusos variancia (B) a felnőttkori tesztekben

SL: hajtáshossz (*shoot length*), TGW: ezerszemtömeg (*thousand grain weight*), Y/P: növényenkénti termés (*yield per plant*), RWC: relatív víztartalom (*relative water content*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*), V_G/V_P: a genetikai eredetű fenotípusos variancia és a teljes fenotípusos variancia hányadosa, V_E/V_P: a környezeti eredetű fenotípusos variancia és a teljes fenotípusos variancia hányadosa, $V_{G\times E}/V_P$: a genetikai és a környezeti eredetű fenotípusos variancia kölcsönhatásából származó és a teljes fenotípusos variancia hányadosa

A

	SL C [cm]			SL S [cm]			TGW C [g]			TGW S [g]			Y/P C [g]			Y/P S [g]		
	DH átlag	min	max	DH átlag	min	Max	DH átlag	min	max	DH átlag	Min	max	DH átlag	min	max	DH átlag	min	max
4. kísérlet																		
Fóliasátor	68,1	37,2	98,4	61,9*	34,5	96,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. kísérlet																		
Üvegház	49,0	22,3	80,2	48,2	24,2	77,1	26,33	18,03	37,34	24,03*	15,94	34,92	1,27	0,44	3,14	1,09*	0,31	2,26
6. kísérlet																		
Fitotron	51,5	21,0	84,3	46,0*	20,8	80,5	25,70	17,19	37,21	26,64	14,92	40,02	2,96	0,79	6,32	0,95***	0,28	2,14
7. kísérlet																		
Esősátor	43,5	20,5	61,5	39,9*	21,0	72,0	22,81	11,68	34,03	20,63*	9,18	32,26	1,90	0,30	4,79	1,82	0,12	4,75
8. kísérlet																		
Szántóföldi kísérlet	-	-	-	40,42	15,0	66,0	-	-	-	20,90	13,75	29,27	-	-	-	2,53	0,76	13,68
9. kísérlet																		
Kémiai deszikáció	-	-	-	-	-	-	29,36	16,82	43,23	25,23*	6,43	35,68	-	-	-	-	-	-

*,*** Szignifikáns $P \leq 0,05$ 0,001 szinten

B

Jelleg	V_G/V_P	V_E/V_P	$V_{G\times E}/V_P$
SL C [cm]	0,16	0,16	0,02
SL S [cm]	0,11	0,16	0,02
SL TI	0,03	0,26	0,03
TGW C [g]	0,06	0,22	0,01
TGW S [g]	0,07	0,17	0,02
TGW TI	0,07	0,14	0,03
Y/P C [g]	0,13	0,07	0,13
Y/P S [g]	0,06	0,05	0,06
Y/P TI	0,05	0,14	0,03

9. táblázat. Az OWB populáció vízháztartással kapcsolatos paraméterei a fitotronban elvégzett tesztben

RWC: relatív víztartalom (*relative water content*), OP: ozmotikus potenciál (*osmotic potential*), OP_{100}: teljes turgoron mért ozmotikus potenciál (*osmotic potential at full turgor*), OA: ozmotikus adaptáció (*osmotic adjustment*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), V_G/V_P: a genetikai eredetű fenotípusos variancia és a teljes fenotípusos variancia hányadosa

Jelleg	Átlag	Min	Max	V_G/V_P
RWC C [%]	91	89	94	0,24
RWC S [%]	79^{***}	54	92	0,19
OP C [Mpa]	-1,57	-1,91	-0, 89	0,18
OP S [Mpa]	$-1,96^{***}$	-2,77	-1,27	0,15
OP_{100} C [Mpa]	-1,44	-1,74	-1,21	0,21
OP_{100} S [Mpa]	$-1,50^{**}$	-1,94	-1,04	0,24
OA [Mpa]	-0,15	-0,36	0,00	0,21

**, ***Szignifikáns $P \leq 0,01$, 0,001 szinten

A felnőtt korban vizsgált jellegek közötti összefüggéseket korrelációs analízissel vizsgáltuk. A különböző élettani folyamatok és a biomassza produkciót jelző pareméterek közötti korreláció jelezheti, hogy az OWB populáció esetében mely jellegek játszanak fontos szerepet a végső termés kialakításában (**10. táblázat**). A felnőtt korban mért hajtáshossz (növénymagasság) gyenge, de szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az ezerszemtömeggel stressz körülmények között. Ezen kívül a virágzási idő szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a növényenkénti terméseredményekkel kontroll körülmények között, míg stressz alatt nem találtunk ilyen összefüggést. Az OP csak kontroll körülmények között, valamint az OP_{100} kontroll és stressz körülmények között egyaránt szignifikáns negatív korrelációt mutatott az ezerszemtömeggel.

10. táblázat. Korreláció a felnőttkorban mért termésparaméterek (*4 – 9. kísérlet*) és egyéb fenotípusos jellegek között

TGW: ezerszemtömeg (*thousand grain weight*), Y/P: növényenkénti termés (*yield per plant*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), HD: kalászolási idő (*heading date*), RWC: relatív víztartalom (*relative water content*), OP: ozmotikus potenciál (*osmotic potential*), OP_{100}: teljes turgoron mért ozmotikus potenciál (*osmotic potential at full turgor*), OA: ozmotikus adaptáció (*osmotic adjustment*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*), AS: felnőtt kor (*adult stage)*, GS: csíranövény kor (*germination stage*), SS: fiatalnövény kor (*seedling stage*)

Jelleg	TGW C	TGW S	Y/P C	Y/P S
SL C (AS)	ns	ns	ns	ns
SL S (AS)	ns	0,16*	ns	ns
HD	ns	ns	0,43**	ns
RWC C	ns	ns	ns	ns
RWC S	ns	ns	ns	ns
OP C	-0,49**	-0,38*	ns	ns
OP S	ns	ns	ns	ns
OP_{100} C	-0,48**	-0,49**	ns	ns
OP_{100} S	-0,36**	-0,33*	ns	ns
OA	ns	ns	ns	ns
SL TI (GS)	ns	ns	-0,31**	-0,22*
RL TI (GS)	ns	ns	- ns	ns
SL TI (SS)	ns	-0,28**	-0,50**	ns
DW TI (SS)	0,16*	ns	-0,23**	0,17*

*, ** Szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 szinten, ns: nem szignifikáns

4.4.2. Az OWB populáción felnőtt korban azonosított lókuszok

A felnőttkori vizsgálatok során összesen 20 QTL-t azonosítottunk, amelyek külön-külön az általunk vizsgált 16 jelleg valamelyikét befolyásolják (**11. táblázat**). Ezek közül egyetlen olyan lókuszt találtunk, amely csak egy környezetben volt szignifikáns hatással a vizsgált jellegre. Ez a fitotronos kísérletben azonosított 7H kromoszómán található QTL (QTL-35) a növényenkénti termést befolyásolja és átfedést mutat a fiatalnövény korban azonosított QTL-ekkel (QTL-13, QTL-14, QTL-15). A másik 19 QTL az összes felnőttkori kísérletben szignifikáns hatást mutatott.

A legnagyobb additív hatással rendelkező QTL-ek, amelyek az ezerszemtömeget, növényenkénti termést és a hajtáshossz befolyásolják a 2H kromoszómán 132,7- 145,7 cM között helyezkednek el. Az összes vízháztartással kapcsolatos jelleg a 7H kromoszómára térképeződött (50,3-55,9 cM) és egybeesett a csíranövénykori gyökérnövekedést befolyásoló lókuszokkal (QTL-6, QTL-7). Ezen kívül még az 1H, 6H, és 7H kromoszómákon (utóbbi a másik 7H kromoszómán azonosított lókusztól disztálisan helyezkedik el) azonosítottunk olyan lókuszokat, amelyek termést és a növénymagasságot befolyásolják.

11. táblázat. Az OWB populáción felnőttkorban azonosított QTL-ek

Kr: kromoszóma, A.E.: additív hatás (*additive effect*), h^2: szűkebb értelemben vett örökíthetőség (*narrow-sense heritability*), TGW: ezerszemtömeg (*thousand grain weight*), Y/P: növényenkénti termés (*yield per plant*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), HD: kalászolási idő (*heading date*), RWC: relatív víztartalom (*relative water content*), OP: ozmotikus potenciál (*osmotic potential*), OP_{100}: teljes turgoron mért ozmotikus potenciál (*osmotic potential at full turgor*), OA: ozmotikus adaptáció (*osmotic adjustment*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*)

QTL No.	Kr.	Jelleg		QTL csúcs (cM)	QTL tartomány	A.E.	P-érték	h^2
16.	1H	Y/P	S	1,0	0,0-12,2	0,16	0,00438**	0,03
17.	2H	Y/P	TI	68,6	67,9-76,5	0,08	0,00091***	0,05
18.	2H	Y/P	S	132,7	129,5-134,7	-0,23	0,00009****	0,04
19.	2H	TGW	C	139,4	134,7-148,7	-3,71	0,00000****	0,06
20.	2H	SL	S	141,4	134,7-147,7	-9,35	0,00000****	0,11
21.	2H	TGW	S	143,4	138,4-147,7	-3,50	0,00000****	0,07
22.	2H	TGW	TI	142,4	137,4-149,7	-0,12	0,00000****	0,07
23.	2H	SL	C	144,7	140,4-146,7	-12,26	0,00000****	0,16
24.	2H	Y/P	C	145,7	139,4-147,7	-0,44	0,00000****	0,11
25.	6H	SL	TI	123,9	116,9-133,9	0,04	0,00001****	0,03
26.	7H	OP	S	50,3	43,8-55,4	-0,36	0,00001****	0,15
27.	7H	OP	C	51,4	43,8-56,1	-0,33	0,00001****	0,18
28.	7H	OP_{100}	S	52,4	49,2-56,1	-0,37	0,00001****	0,24
29.	7H	RWC	C	53,4	49,2-58,0	0,23	0,00001****	0,24
30.	7H	OP_{100}	C	53,4	50,3-58,0	-0,34	0,00001****	0,21
31.	7H	RWC	S	55,9	50,4-59,0	0,18	0,00001****	0,19
32.	7H	RWC	TI	55,9	50,3-59,0	0,18	0,00002****	0,16
33.	7H	OA		55,9	50,4-59,0	-0,04	0,00000****	0,21
34.	7H	Y/P	C	62,9	61,5-63,3	0,20	0,00216***	0,02
35. #	7H	Y/P	C	80,9	80,9-81,8	0,80	0,00000****	0,23

, *, **** Szignifikáns $P \leq 0,01, 0,001, 0,0001$ szinten

Csak a fitotronos kísérletben (6. kísérlet) mutatott szignifikáns hatást

4.5. Teljes életciklus során szerepet játszó hajtáshosszt befolyásoló QTL-ek az OWB populáción

A különböző fejlődési fázisokban elvégzett vizsgálatok során egyedül a hajtáshossz volt az a jelleg, amelyet mind a három fejlődési fázisban vizsgáltunk. A QTL analízist követően összesen két olyan lókuszt azonosítottunk, amelyek a hajtáshossz (növénymagasság) kialakításában minden egyedfejlődési fázisban szerepet játszottak (**12. táblázat)**. A nagyobb hatású kontroll és stressz körülmények között is azonosított lókusz (QTL-36, QTL-37) a csíranövény és felnőtt korban is megtalált 2H kromoszómán található QTL-ek (QTL-1, QTL-2 és QTL-20) pozíciójával esett egybe. Egy olyan kisebb hatású új lókuszt is találtunk az 1H kromoszómán, amelyet az egyes egyedfejlődési fázisokban külön nem azonosítottunk (**12. táblázat**).

12. táblázat. A teljes életciklus során szerepet játszó hajtáshosszt befolyásoló QTL-ek kontroll és stressz körülmények között

Kr: kromoszóma, A.E.: additív hatás (*additive effect*), h^2: szűkebb értelemben vett örökíthetőség (*narrow-sense heritability*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*)

QTL No.	Kr.	Jelleg		QTL csúcs (cM)	QTL tartomány	A.E.	P-érték	h^2
36.	1H	SL	C	118,1	113,6-121,1	-1,72	0,00026***	0,01
37.	2H	SL	S	141,4	136,4-146,7	-4,23	0,00000****	0,15
38.	2H	SL	C	145,7	145,7-146,7	-4,83	0,00000****	0,16

, * Szignifikáns P ≤ 0,001, 0,0001 szinten

Ez a három lókusz, minden általunk vizsgált egyedfeljődési fázisban szerepet játszott a hajtáshossz kialakításában, azonban az egyes fejlődési fázisokban eltérő hatást mutatott. Csíranövény és fiatalnövény korban - amelyek időben nem állnak távol egymástól - a lókuszok additív hatása a 'REC' szülőtől származott. Ezzel szemben felnőtt korban a másik szülői vonaltól származó allél mutatott pozitív hatást (**13. táblázat**). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a lókuszok szerepe különböző fejlődési fázisokban eltérő lehet, illetve egy adott gén/QTL által kódolt tulajdonság a tolerancia szempontjából fejlődési fázistól függően előnyös, semleges, vagy akár hátrányos is lehet.

13. táblázat. Az additív hatás és a fejlődési fázis kölcsönhatásának (a × f) szerepe a hajtáshosszt befolyásoló QTL-ek esetében. A QTL-ek számozása megegyezik a 11. táblázatéval.

QTL Nr.	a × f		
	csíranövény kor	fiatalnövény kor	felnőtt kor
36.	0,93	1,31	-2,26**
37.	3,60****	3,18****	-6,60****
38.	3,31****	2,99***	-6,14****

, *, **** Szignifikáns P ≤ 0,01, 0,001, 0,0001 szinten

4.6. Az OWB populáción több fejlődési fázisban azonosított átfedő régiók

Az OWB populáción azonosított QTL-ek összevetése során olyan átfedő genomi regiókat, QTL klasztereket sikerült azonosítanunk, amelyek különböző ozmotikus vagy szárazságtűréssel kapcsolatba hozható jellegeket befolyásolnak és több fejlődési fázisban is szerepet játszanak. Az egyes QTL-ek konfidencia intervallumai alapján a szignifikáns hatást mutató átfedő QTL-eket egy régiónak tekintettük és legvalószínűbb pozíciójukat a QTL csúcsok átlagolásával határoztuk meg, Price (2006) módszere alapján.

Az általunk azonosított összes QTL-t figyelembe véve öt olyan régiót azonosítottunk, amely több jelleget befolyásol, és legalább két fejlődési fázisban is szerepet játszik. Ezek a régiók a 2H

(*QDr.OWB-2H*), 5H (*QDr.OWB-5H*), 6H (*QDr.OWB-6H*) és 7H (*QDr1.OWB-7H* és *QDr2.OWB-7H*) kromoszómákon helyezkednek el (**14. táblázat**). Az 5H és 6H kromoszómákon azonosított régiók csak stressz körülmények között, illetve tolerancia indexek esetében azonosítottuk. *A QDr.OWB-5H* régió hajtás és gyökérhossz növekedést befolyásol csíranövény korban és hajtás száraztömeget fiatalnövény korban, a *QDr.OWB-6H* pedig hajtáshossz tolerancia indexet fiatalnövény és felnőtt korban. A másik három régió kontroll és stressz körülmények között egyaránt szerepet játszik. Az öt régió közül a *QDr2.OWB*-7H QTL klaszter volt az egyetlen, amelyet különböző jellegek esetében, de mind a három fejlődési fázisban azonosítottunk

4.7. Az EST szekvenciák funkcionális fehérjékkel mutatott homológiája

Az általunk azonosított öt QTL klaszter feltételezéseink szerint egyedi gének hatásának köszönhető. Ezek szerint a QTL-ek / gének legvalószínűbb előfordulási pozíciójába (csúcspozíció) eső EST markerek szekvenciáit felhasználva az azonosított régiók funkciójára is következtethetünk. A EST szekvenciák alapján az NCBI és a HarvEST adatbázis segítségével megkerestük az adott lókuszhoz tartozó, több forrásból származó összerendezett mRNS szekvenciákat (*Unigene, transcript assembly*) és homológiakeresést végeztünk az NCBI fehérjeadatbázisával szemben. A használt *Unigene*-ek azonosítóját, lehetséges funkcióját és a feltételezett rizs homológokat a **14. táblázat** foglalja össze.

14. táblázat. Az OWB populáción több fejlődési fázisban azonosított szárazság- és ozmotikus stressztűréssel kapcsolatba hozható régiók és feltételezett funkciójuk a rizs homológ génjei alapján. Az árpagyűjetmény esetében vizsgált markereket aláhúzással jelöltük.

TGW: ezerszemtömeg (*thousand grain weight*), Y/P: növényenkénti termés (*yield per plant*), SL: hajtáshossz (*shoot length*), DW: hajtás száraztömeg (*dry weight*), RWC: relatív víztartalom (*relative water content*), OP: ozmotikus potenciál (*osmotic potential*), OP_{100}: teljes turgoron mért ozmotikus potenciál (*osmotic potential at full turgor*), OA: ozmotikus adaptáció (*osmotic adjustment*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*), GS: csíranövény kor (*germination stage*), SS: fiatalnövény kor (*seedling stage*), AS: felnőtt kor (*adult stage).*

14. táblázat

Kr.	QTL tartomány, csúcs (cM), QTL név	Fázis	Jelleg	EST markerek a csúcs-régióban	HarvEST /NCBI unigene, annotáció	Legjobb rizs BLASTx találat (E value)	GBM marker a csúcs-régiótól ± 2.5 cM
2H	129,5-157,0 **143,3±5,9** ***QDr.OWB-2H***	GS	SL C	***GBM1498***	22083/Hv.21082	*Os04g0648900,* Dehydration responsive element binding protein 2F ($9e^{-39}$)	
		AS	Y/Pl C, Y/Pl S, SL C, SL S, TGW C, TGW S, TGW TI	***GBR0421***	15016/Hv.3943 Papain-like cysteine proteinase	*Os04g0650000*, Peptidase C1A (0,0)	
5H	50,5-79,5 **68,6±2,8** ***QDr.OWB-5H***	GS	SL S, SL TI, RL TI	***GBS0318***	1234/Hv.20699 Hypersensitive-induced reaction protein 3	*Os05g0591900,* Hypersensitive-induced response protein ($3e^{-145}$)	
		SS	DW S, DW TI	***GBR0331***	2991/Hv.1571	*Os12g0236500*, Aspartyl aminopeptidase-like protein ($2e^{-127}$)	
				GBS0042	46904/-	*Os11g0213700*, Leucine rich repeat family protein ($2e^{-15}$)	
				GBR1057	959/Hv.2703	*Os09g0440300*, Aldehyde dehydrogenase (0,0)	
				GBS0410	20158/Hv.24342	*Os09g0397300*, Trehalose-6-phosphate synthase ($8e^{-5}$)	
6H	116,9-133,9 **123,9±0,0** ***QDr.OWB-6H***	SS	SL TI	***GBR1052***	1581/Hv.3015	*Os02g0830100*, Oligopeptidase A ($2e^{-42}$)	***GBM1404*** (122,7)
		AS	SL TI				

7H	43,8-64,2 **55,1±3,5** ***QDr1.OWB-7H***	GS	RL C, RL S	***GBR0074***	14603/Hv.23143	*Os04g0189400*, Gamma purothionin family protein ($3e^{-12}$)
		AS	OP C, OP S, OP100 C, OP100 S, OA, RWC C, RWC S, RWC TI, Y/Pl C	***GBR0637***	776/Hv. 1786	*Os06g0556000*, Amino acid transporter protein ($3e^{-129}$)
7H	72,8-93,8 **79,8±3,5** ***QDr2.OWB-7H***	GS	SL S	***GBM1359***	2085/Hv.10941	*Os06g0574500*, Serine/threonine protein phosphatase 2A ($3e^{-178}$)
		SS	DW C, DW S, SL C, SL S	***GBR0283***	1360/Hv.5549	*Os08g0327400*, Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase ($3e^{-171}$)
		AS	Y/Pl C	***GBS0132***	1421/Hv.3726	*Os03g0581800*, Unknown ($3e^{-16}$)
				GBR1558	-/Hv23703	*Os02g0148100,* Mitogen-activated protein kinase ($3e^{-29}$)
				GBR1478	15744/Hv.26216	*Os02g0782700*, Ethylene responsive element binding protein ($5e^{-128}$)
				GBS0405	653/Hv.14629	*Os02g0200900,* Leucine-rich repeat, cysteine-containing protein (0,0)
				GBS0040	24588/Hv.1684	*Os06g0609700*, Esterase/lipase/thioesterase domain containing protein ($9e^{-14}$)

4.8. Az árpagyűjtemény tesztelése

4.8.1. Az árpagyűjtemény fenotípusos adatai

Az árpagyűjtemény vizsgálatával az OWB populáción azonosított, szárazságtűréssel kapcsolatos régiók független genetikai háttérben történő ellenőrzését tűztük ki célul. A 39 genotípust az OWB populációnál alkalmazott kísérleti beállításokhoz hasonló körülmények között vizsgáltuk. A csíranövény teszt, a fiatalnövénykori vízkultúrás kísérlet és a felnőttkori deszikkációs teszt fenotípusos eredményeit az **15. táblázat** foglalja össze. A kezelések hatása minden kísérletben szignifikáns volt.

15. táblázat. Az árpagyűjtemény 39 vonalának fenotípusos átlagértékei a három fejlődési fázisban elvégzett tesztekben

SL: hajtáshossz (*shoot length*), RL: gyökérhossz (*root length*), DW: hajtás száraztömeg (*dry weight*), Y/S: kalászonkénti termés (*yield per spike*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*)

Csíranövény teszt	Korrigált átlag ± SE	min	max
SL C [cm]	13,5 ± 0,2	9,9	18,9
SL S [cm]	7,3 ± 0,2***	0,9	12,2
SL TI	0,52 ± 0,01	0,20	0,75
RL C [cm]	13,4 ± 0,3	7,7	19,0
RL S [cm]	7,0 ± 0,2***	2,2	11,6
RL TI	0,54 ± 0,01	0,09	0,75
Fiatalnövény teszt			
DW C [mg/növény]	174,91 ± 3,63	114,11	276,33
DW S [mg/növény]	99,34 ±2,14***	59,78	164,43
DW TI	0,59 ±0,01	0,30	0,94
Felnőttkori teszt			
Y/S C [g]	1,86 ±0,08	0,69	3,38
Y/S S [g]	1,34 ± 0,06**	0,23	2,52
Y/S TI	0,74 ± 0,02	0,31	1,02
TGW C [g]	57,11 ± 0,62	43,41	69,87
TGW S [g]	42,41 ± 0,99**	17,27	59,80
TGW TI	0,74 ± 0,01	0,34	0,93

, * Szignifikáns $P \leq 0,01$, 0,001 szinten

4.8.2. Kiválasztott markerek tesztelése az árpagyűjteményen

Marker alapú szelekcióra elsősorban olyan típusú marker használható, amely nagy számú genotípus vizsgálatára alkalmas, egyszerű és költséghatékony. Ezeket a feltételeket a mikroszatellit markerek (esetünkben GBM markerek - *gatersleben barley microsatellite*) teljes mértékben kielégítik, ezért további vizsgálatainhoz ilyen típusú markereket választottunk ki. Az általunk azonosított öt QTL-klaszter csúcsrégiójába eső EST szekvenciák közül a 2H *(QDr.OWB-2H)* és a 7H *(QDr2.OWB-7H)* kromoszómán található *GBM1498* és *GBM1359* markerek mikroszatellit polimorfizmuson alapulnak. A másik három esetben, ahol nem volt mikroszatellit a QTL klaszter csúcsrégiójában a szegélyező 2,5 cM-t is megvizsgáltuk. Irodalmi adatok alapján marker alapú szelekcióra – a szoros kapcsoltság miatt - ez a távolság még megfelelőnek tűnik. A 6H

kromoszómán található klaszter esetében *(QDr.OWB-6H)* sikerült találni egy közel eső GBM markert, az 5H *(QDr.OWB-5H)* és 7H *(QDr1.OWB-7H)* kromoszómákon azonosított régiók esetében azonban nem. Az árpagyűjtemény genetikai háttere és a fenotípusos eloszlás közötti kapcsolat erősségének vizsgálatára ezért a *GBM1359, GBM1404* és a *GBM1498* mikroszatellit markereket használtuk fel.

Az árpagyűjtemény genotipizálása során a *GBM1359* és *GBM1404* markerek esetében kettő a *GBM1498* esetében pedig három alléltípust (két homozigóta és egy heterozigóta egyedet) azonosítottunk (**Melléklet, M4**). A *GBM1498* markerre heterozigóta genotípusokat a statisztikai analízisből kizártuk. Az árpagyűjteményen belüli alléltípusok eloszlása nem függött össze a vizsgált genotípusok eredetével és azzal, hogy tájfajtáról vagy fajtáról van szó.

A 39 árpa genotípus különböző alléljai alapján képzett csoportok fenotípusos értékeit mindhárom fejlődési fázisban összehasonlítottuk, és az egyes csoportok között hat esetben szignifikáns különbséget találtunk (**16. táblázat**). Mindhárom marker esetében különbözött egymástól az eltérő allélt hordozó genotípusok stressz alatt mért termés mennyisége, a legnagyobb szignifikáns hatást azonban *GBM1359* markernél találtuk. Ebben az esetben a két csoport kalászonkénti termése között 36 % különbség volt. A *GBM1498* és a *GBM1359* markereknél csíranövénykorban mért hajtáshossz értékek az allélcsoportok között szintén szignifikáns különbséget mutattak.

16. táblázat. Az árpagyűjteményen vizsgált SSR markerek különböző alléljait hordozó genotípusok fenotípusos átlagértékei

SL: hajtáshossz (*shoot length*), RL: gyökérhossz (*root length*), DW: hajtás száraztömeg (*dry weight*), Y/S: kalászonkénti termés (*yield per spike*), C: kontroll (*control*), S: stressz kezelt (*stressed*), TI: tolerancia index (*tolerance index*)

		Korrigált átlag ± SE		
	Jelleg	*GBM1498* (2H)	*GBM1404* (6H)	*GBM1359* (7H)
Csíranövény kor	SL C (cm)	**14,1 ± 0,8/13,1** ± 0,8**	13,4 ± 1,0/13,4 ± 0,9	**13,7 ± 0,9/12,7* ± 0,9**
	SL S (cm)	**8,0 ± 0,3/6,9* ± 0,3**	7,7 ± 0,9/7,2 ± 0,7	7,4 ± 0,7/6,8 ± 0,8
	SL TI	0,55 ± 0,03/0,51 ± 0,03	7,84 ± 0,60/6,92 ± 0,26	0,52 ± 0,03/0,54 ± 0,04
	RL C (cm)	13,1 ± 0,5/13,6 ± 0,4	0,6 ± 0,0/0,5 ± 0,0	13,5 ± 0,3/12,7 ± 0,7
	RL S (cm)	7,2 ± 0,3/7,0 ± 0,3	13,6 ± 0,7/12,7 ± 0,3	7,2 ± 0,2/6,5 ± 0,5
	RL TI	0,56 ± 0,02/0,53 ±0,02	0,54 ± 0,04/0,54 ± 0,02	0,54 ± 0,02/0,53 ± 0,03
Fiatalnövény kor	DW C (mg/növény)	181,95 ± 14,13/172,59 ± 13,64	164,38 ± 15,42/178,67 ± 12,20	175,39 ± 12,31/172,65 ± 14,55
	DW S (mg/ növény)	100,70 ± 4,31/100,04 ± 3,72	128,98 ± 46,31/145,61 ± 45,51	98,08 ± 3,09/105,25 ± 5,47
	DW TI (mg/ növény)	0,56 ± 0,03/0,59 ± 0,02	0,55 ± 0,04/0,59 ± 0,02	0,57 ± 0,02/0,62 ± 0,03
Felnőtt kor	Y/S C (g)	2,08 ± 0,14/1,80 ± 0,11	1,54 ± 0,22/1,91 ± 0,11	1,80 ± 0,10/2,17 ± 0,19
	Y/S S (g)	**1,55 ± 0,19 /1,28 ± 0,18***	**0,99 ± 0,23/1,39* ± 0,17**	**1,26 ± 0,16/1,71** ± 0,20**
	Y/S TI	0,78 ± 0,07/0,72 ± 0,07	0,67 ± 0,08/0,75 ± 0,06	0,72 ± 0,06/0,81 ± 0,07
	TGW C (g)	57,29 ± 1,42/57,38 ± 1,25	56,50 ± 1,81/57,20 ± 0,82	57,31 ± 0,82/56,13 ± 1,60
	TGW S (g)	41,53 ± 2,86/43,40 ± 2,67	37,90 ± 2,77/40,06 ± 1,09	42,06 ± 2,60/44,07 ± 3,37
	TGW TI	0,71 ± 0,04/0,76 ± 0,03	0,69 ± 0,05/0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,04/0,76 ± 0,05
Alléltípusok száma		2	2	2
Genotípus (db) / alléltípus #		22/14$^{\#\#}$	33/6	32/7

*, ** Szignifikáns $P \leq 0,05$, 0,01 szinten**,** a szignifikáns eltéréseket vastagon szedett betűtípussal is jelötük

Az adott allélokat hordozó genotípusok száma az alléltípus-csoportokon belül

$^{\#\#}$ A *GBM1498* esetében azonosított három heterozigóta genotípus nem szerepel az analízisben

4.9. Az eredmények megvitatása

4.9.1. Az OWB populáció vizsgálata során alkalmazott kísérleti beállítások értékelése

Az általunk használt kísérlettípusok többsége a szárazságtűrés különböző részjelenségeit modellezi. Olyan országokban, ahol az éghajlati adottságok miatt állandó a vízhiány, a szántóföldi kísérletek szárazságtűrési vizsgálatoknak tekinthetőek. Hazánkban a különböző években mért csapadék mennyisége és eloszlása évről évre változik, ezért a szárazságtűrési kísérletek során a természetes csapadék kizárására lehet szükség. Ennek egyik hatékonyabb módja a mozgatható tolótetős fóliasátor. Ha a tető csak eső esetén tartózkodik a kísérleti terület fölött a túlmelegedés minimális, és a kísérleti parcellákon termesztett növények fenotípusa között kialakuló különbség elsősorban a vízhiánynak tulajdonítható. Az általunk is használt kísérleti beállítások összefoglalását a **17. táblázat** szemlélteti.

17. táblázat. A szárazságtűrés vizsgálatára használható kísérleti beállítások jellemzőinek összefoglalása

Módszer	Előny	Hátrány
Csíranövény teszt ozmotikum alkalmazásával	-gyors -egyszerű -olcsó -ismételhető -sok adatot szolgáltat rövid időn belül -nagyszámú genotípus tesztelésére is alkalmas	-ozmotikus stressztűrést és nem szárazságtűrést vizsgál -nem nyújt megbízható információt a felnőttkori toleranciáról
Vízkultúrás kísérlet ozmotikum alkalmazásával	-a stressz mértéke jól és egyszerűen szabályozható -ismételhető -molekuláris és élettani vizsgálatokra jól használható	-ozmotikus stressztűrést és nem szárazságtűrést vizsgál -speciális növénynevelő edények szükségesek -nem nyújt megbízható információt a felnőttkori toleranciáról -néhány hetes időtartamra használható -gyökér eltérően viselkedik vízkultúrában -vizsgálható vonalak száma korlátozott
Üvegházi és fóliasátras kísérletek talajos rendszerben	-kontrollálható öntözési körülmények -megbízhatóbb tolerancia információk	-költségesebb nevelés -munkaerőigényes locsolás - túlmelegedés
Fitotronos kísérlet	-kontrollálható -ismételhető -egyedileg nevelt növényeknél a stressz kezdete növényenként beállítható	-drága -munkaerőigényes locsolás -egyedileg nevelt növények viselkedése eltér a szántóföldön nevelt növényekétől
Mozgatható tolótetős fóliasátor	-szántóföldhöz hasonló körülmények -kontrollálható vízellátottság -költséghatékony	-több éves tesztelés szükséges -környezeti hatás -stressz kezdete késői és korai fajták esetén eltérő egyedjelődési fázisban éri a növényeket
Szántóföldi szárazságstressz	-természetszerű szárazságstressz -nagyszámú genotípus vizsgálata lehetséges -olcsó	-több éves tesztelés szükséges -nagy környezeti hatás -stressz mértéke időjárásfüggő

4.9.2. A szegregáló morfológiai- és a vizsgált fenotípusos jellegek szerepe az OWB populáció szárazságtűrésében

Az OWB populáció szülői vonalai számos morfológiai jelleg esetében különböznek (pl.: két és hatsoros kalásztípus, pelyvás vagy pelyvátlan szem, fekete vagy fehér kalász, stb.). A populációban megfigyelhető hasadó morfológiai jellegek esetleges hatását a QTL analízist követően az azonosított lókuszok és morfológiai jellegekért felelős gének pozíciójának összevetésével vizsgáltuk. A korábban térképezett morfológiai jellegek szerepe a 2H és a 7H kromoszómákon azonosított QTL klaszterek esetében merült fel. A 2H-án elhelyezkedő QTL hatást a közel elhelyezkedő tömött kalászmorfológiáért és csökkent növénymagasságért felelős *Zeo1*, míg a 7H-án azonosított QTL hatást a szemtermés pelyvás és pelyvátlan fenotípusát meghatározó *nud* gén is okozhatta. Mivel azonban az árpagyűjtemény minden vonala pelyvás és normális kalászmorfológiájú, továbbá a *nud* és a *Zeo1* gének közelében elhelyezkedő markerek alléltípusai között (*GBM1359* és *GBM1498*) szignifikáns fenotípusos különbséget találtunk, ennek a két génnek a kifejezett hatását az azonosított QTL klaszterek esetében nagy valószínűséggel kizárhatjuk.

Az OWB populáció esetében stressz alatt pozitív kapcsolatot találtunk a növénymagasság és az ezerszemtömeg között. Vízhiányos környezetben a nagyobb növénymagasság és a jobb termőképesség közötti kapcsolatot más populációk vizsgálata során is leírták, melyet a növénymagasságot és termést befolyásoló QTL-ek egybeesése is alátámaszt (von Korff *et al.* 2008, Baum *et al.* 2003, Maccaferri *et al.* 2008). Irodalmi adatok alapján a vízhiányos szántóföldi körülmények között mért növénymagasság és termés közötti pozitív összefüggést a hajtás és gyökérhossz között feltételezett pozitív összefüggéssel indokolták (Baum *et al.* 2003). Kontroll körülmények között a nagy növénymagasság alapvetően hátrányos, mert a magasabb növények könnyebben megdőlnek. Vízhiány esetén ezzel ellentétben a magasabb, de hosszabb gyökérrel rendelkező növény előnybe kerülhet az alacsonyabb, de rövid gyökérrel rendelkező növényhez képest. Az OWB populáción megfigyelt gyökér és hajtáshossz, valamint a hajtáshossz és termés közötti pozitív korreláció szintén ezt a feltevést támogatja, azonban a gyenge korreláció miatt a gyökérhossz kifejezett szerepe az OWB populáció esetében nem valószínű.

A korai virágzás egy jól ismert adaptív tulajdonság, amely előnyös lehet a késői szárazság elkerülésében. A szélsőséges koraiság ezzel szemben gyakran összefügg kis biomasszaprodukcióval és alacsony termőképességgel (Reynolds *et al. 2007)*. Az OWB populáció esetében nem találtunk összefüggést a virágzási idő és a termés között stressz körülmények alatt. Következtetésünk szerint a korai virágzás előnye elsősorban a természetben érvényesül, ellenőrzött körülmények között, virágzást követő stressz esetén szerepe azonban nem kifejezett. Különböző árpa fajták vizsgálata során szintén azt tapasztalták, hogy a tolerancia mértéke késői szárazságstressz esetén nem függött a kalászolási időtől (Samarah *et al. 2009*). Kontroll körülmények között ez az összefüggés nem áll

fenn, sőt, az OWB populáció később virágzó genotípusai nagyobb termést érleltek. A virágzási idő és a kontroll körülmények alatti termés mennyisége között megfigyelt pozitív korreláció alapján, kontrollált kísérleti körülmények között a hosszabb vegetatív fázis előnyös tulajdonság lehet.

Az általunk vizsgált populáció esetében a teljes turgoron mért ozmotikus potenciál szignifikánsan korrelált az ezerszemtömeg értékekkel kontroll és stressz körülmények között egyaránt. Ezen a populáción tehát az ozmotikus adaptációs képesség (OA) helyett az ozmotikusan aktív anyagok abszolút mennyisége tűnik a legfontosabb, termésparaméterrel összefüggő élettani jellegnek.

A csíranövény és fiatalnövény korban mért tolerancia csak gyenge pozitív, illetve szorosabb negatív korrelációt mutatott a végső termőképességgel, azaz a felnőttkori toleranciával. Az OWB populáció különböző fejlődési fázisaiban mért adatok alapján megerősíthetjük, hogy a szárazságtűrés egy egyedfejlődés specifikus komplex tulajdonság és az egyes jellegek szerepe fejlődési fázisonként eltérő lehet. A térképezési populációk szülői vonalainak tesztelése során is arra a következtetésre jutottunk, hogy az egyes vonalak egymáshoz viszonyított toleranciája nagyban függ a vizsgált genotípus egyedfejlődési fázisától és az alkalmazott vizsgálati módszertől. Ezen eredmények alapján a korai fejlődési fázisokban végzett vizsgálatok nem használhatók megbízhatóan fenőttkori tolerancia becslésére. Megbízhatóan toleráns vonalak előállításához a szelekciót az adott célkörnyezetben kell elvégezni.

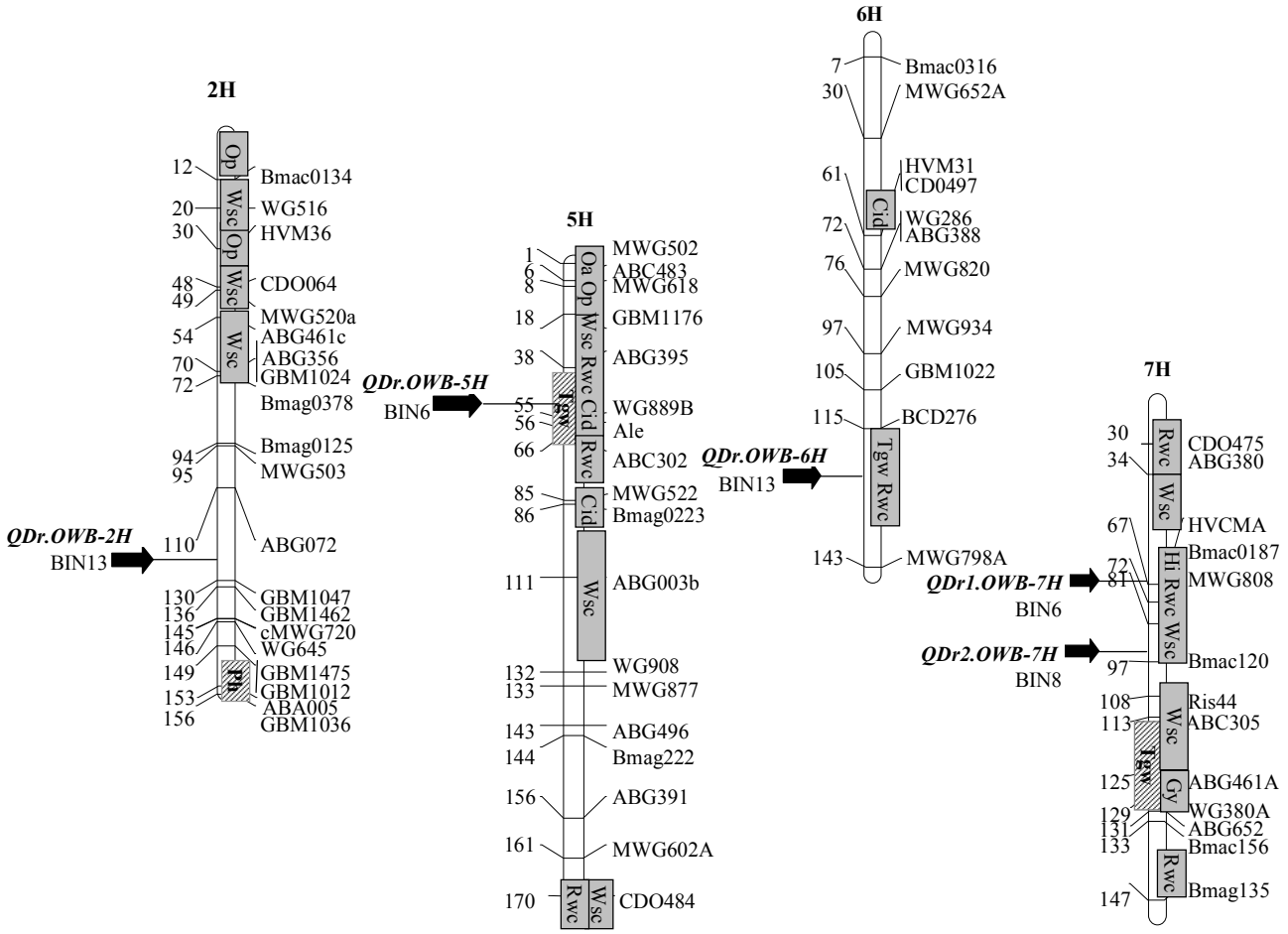
4.9.3. Az OWB populáción azonosított QTL-ek összehasonlítása ismert lókuszokkal

Irodalomi adatok alapján több olyan genomi régiót ismerünk, amelyek szárazságtűréssel kapcsolatos jellegek kifejeződését befolyásolják. A különböző kutatócsoportok által azonosított szárazságtűrést befolyásoló lókuszok azonban nem feltétlenül azonosak. Mivel a szárazságtűrés összetett jelleg, a tolerancia kialakításában különböző környezetben és genetikai hatttérben eltérő mechanizmusok játszhatnak szerepet. A több, független környezetben elvégzett vizsgálat azonban a szárazságtűrés egyre több részletét tárja fel, amelyek együttesen elvezethetnek a szárazságtűrés összetett folyamatának megismeréséhez.

Teulat és munkatársai (2001a, 2001b, 2002, 2003) a ‘Tadmor’ × ‘Er/Apm’ populáció felhasználásával számos szárazságtűréssel összefüggő jelleget (pl.: OP, OA, RWC, vízoldható szénhidráttartalom, szén izotóp diszkriminációs képesség, termés paraméterek vízhiányos környezetben) befolyásoló lókuszt azonosított árpán. Ezek a QTL-ek átlalában a teljes fenotípusos variancia 15 % -át magyarázták. Az általunk azonosított régiók a fenotípusos variancia 13 - 47 % -áért voltak felelősek. Irodalmi adatok alapján a terméssel és egyéb biomassza produkcióval összefüggésben azonosított QTL-ek leggyakrabban a fenotípusos variancia kb. 10 %-át magyarázzák (Maccaferri *et al. 2008.*). Figyelembe véve ezeket az adatokat, továbbá azt, hogy az

idáig közölt szárazságtűréssel foglalkozó publikációk egyike sem számolt be nagyhatású, termést befolyásoló QTL-ről, a szárazságtűrés fokozását több, kis additív hatású gén együttes szerepétől várhatjuk.

A QTL-eken kívül számos szárazságtűréssel kapcsolatba hozható EST-t és jelölt gént is azonosítottak a 'Tadmor' × 'ErApm' populáció segítségével (Tondelli *et al.* 2006). A 'Steptoe' × 'Morex' populáció vizsgálata során szintén azonosítottak olyan régiókat, amelyek kapcsolatba hozhatóak a termésképzéssel rossz csapadékellátottságú környezetben (Irán) (Peighambari *et al.* 2005). Az általunk azonosított öt lókusz többsége átfedést mutatott ezekkel a korábban, más populációkon is azonosított régiókkal. A jelenleg ismert és az általunk azonosított főbb régiók egymáshoz viszonyított elhelyezkedését egy árpa konszenzus térkép segítségével szemléltetve a **8. ábra** mutatja.



8. ábra

Különböző genetikai háttérben azonosított, szárazságtűréssel kapcsolatba hozható régiók elhelyezkedése árpán

Az ábrázolt genetikai térkép Marcel és munkatársai (2007) által készített árpa konszenzus térkép alapján készült. Szürke téglalappal a 'Tadmor' ×'Er/Apm' populáción (Teulat *et al.* 2001a, 2001b, 2002, 2003), csíkos téglalappal pedig a 'Steptoe' × 'Morex' populáción (Peighambari *et al.* 2005) azonosított régiókat jelöltük. A kromoszómák jobb oldalán elhelyezett fekete nyilak az OWB populáción azonosított öt QTL-klasztert jelöli. Op: ozmotikus potenciál (*osmotic*

potential), Wsc: vízoldható szénhidráttartalom (*water soluble carbohydrate content*), Tgw: ezerszemtömeg (*thousand grain weight*), Ph: növénymagasság (*plant height*), Rwc: relatív víztartalom (*relative water content*), Oa: ozmotikus adaptáció (*osmotic adjustment*), Cid: szén izotóp diszkrimináció (*carbone isotope discrimation*), Hi: harvest index, Gy: termés (*grain yield*)

Irodalmi adatok alapján az egyik legígéretesebbnek a 6H kromoszóma hosszú karján található régió tűnik. Korábban, mediterrán környezetben ezerszemtömeget befolyásoló, valamint kontroll körülmények között a relatív víztartalmat befolyásoló régióként azonosították (Teulat *et al.* 2003), az OWB populáció esetében azonban a stressz alatti hajtáshossz növekedéssel hozható összefüggésbe. Egy másik általunk azonosított 5H kromoszómán található stressz specifikus QTL egybeesik a 'Steptoe' × 'Morex' populáción azonosított ezerszemtömeget befolyásoló régióval, valamint a 'Tadmor' × 'Er/Apm' populáción térképezett fiziológiai jellegekkel összefüggésbe hozható régióval. A 7H kromoszómán azonosított két egymáshoz közel eső QTL szintén átfedést mutat a 'Tadmor' × 'Er/Apm' populáción azonosított Harvest Indexet, RWC-t és vízoldható szénhidráttartalmat befolyásoló QTL-ekkel. A jó ozmoregulációs képességet és az RWC-t befolyásoló régiók egybeesése feltételezhetően ugyanannak a génnek/géneknek a pleiotróp hatásával magyarázható (Diab *et al.* 2004).

A fiziológiai jellegekkel kapcsolatos QTL-ekről általánosságban elmondható, hogy a sejtfunkciók fenntartásában játszanak szerepet, azonban átfedésük egyéb biomasszaprodukciót befolyásoló lókuszokkal a végső termés kialakításában játszott szerepükre utal. Ezek alapján több, szárazságtűrést befolyásoló QTL-klaszter léte igazolódott be, amelyek a növekedést, környezeti stresszekre adott válaszokat és a termést is befolyásolhatják. Tekintettel arra, hogy a termőképesség növelését célzó nemesítési törekvések sikeresek voltak a szárazságra történő direkt szelekció nélkül is (Tuberosa és Salvi 2006), ezek a nem tisztán stressz specifikus régiók is fontosak lehetnek a szárazságtűrés genetikai hátterének, illetve a vízhiány alatti termésképzés folyamatának megismerésében.

4.9.4. Az azonosított QTL-ek feltételezett funkciója EST szekvenciák alapján

Az OWB populáción azonosított öt, szárazságtűréssel összefüggő régió feltételezett funkciójára a régiókba eső EST markerek szekvenciaadatai alapján következtethetünk.

A ***QDr.OWB-2H*** régióba eső *GBM1498* markerhez kapcsolt szekvencia annotációja alapján egy hipotetikus DREB proteint (*dehydration responsive element binding protein 2F*) kódol. Annak ellenére, hogy több DREB gént jellemeztek már az elmúlt évtizedben legtöbbjük funkciója még ismeretlen. Ez az általunk azonosított DREB protein a rizs *OsDREB2A*-val mutatott hasonlóságot, amelynek szerepét a szárazság indukálta génexpressziós változások szabályozásában már igazolták

(Dubouzet *et al. 2003*). Ezek alapján feltételezhető, hogy árpában is hasonló funkcióval rendelkezik.

Ebben a régióban azonosított másik EST marker egy papain-szerű cisztein proteinázt kódol. Ennek a fehérjének a legközelebbi, *Arabidopsisban* is leírt homológja az *rd21* gén (*responsive to dehydration 21*), amely egy jól ismert szárazság indukálható cisztein proteináz (Koizumi *et al.* 1993).

Az 5H kromoszómán (***QDr.OWB-5H***), többek között egy aldehid-dehidrogenázt (ALDH) kódoló gént is azonosítottunk, amely a fehérjék és lipidek reaktív oxigénformákkal való reakciója során képződő toxikus vegyületek (pl.: aldehidek) semlegesítésében játszik szerepet (Sunkar *et al.* 2003). Számos ALDH gén fokozott transzkripcióját is leírták különböző, vízhiányt okozó kezelések során (Ozturk *et al.* 2002, Talame *et al.* 2007), valamint az *Arabidopsis* Ath-ALDH3 gén transzgénikus növényekben történt túltermeltetése is fokozott stressztoleranciát idézett elő (Sunkar *et al.* 2003). Ezek az eredmények az aldehid-dehidrogenázok szárazságtűrésben játszott általános szerepére utalnak.

Egy másik *QDr.OWB-5H* régióba eső EST marker (*GBS0410*), amely egy trehalóz-6-foszfát szintázt (*TSP1*) kódol, irodalmi adatok alapján szintén szárazságtűréshez kapcsolható. A trehalóz abiotikus stressz alatt különböző makromolekulák integritásának megőrzésében játszik szerepet. A trehalóz szintéziséért felelős *TSP1* túltermeltetése dohányban és burgonyában is jelentősen növelte a szárazságtűrést (Cherian *et al.* 2006).

Egy *hypersensitive-induced reaction protein*-t (HIR3) szintén azonosítottunk a *QDr.OWB-5H* régióban, amely az általános nézetek szerint elsősorban a biotikus stresszválaszokhoz kapcsoltan játszik szerepet (Nadimpalli *et al.* 2000). A stresszhatások során a reaktív oxigénformák mennyisége általánosan növekszik (Meyer 2008), és például a semlegesítésükben szerepet játszó mechanizmusokon keresztül a különböző típusú stressztválaszok jelentősen átfedhetnek. A HIR proteinek abiotikus stressz során betöltött szerepét transzgénikus növények segítségével már igazolták (Jung *et al.* 2008), és azt tapasztalták, hogy a *CaHIR1*-et túlexpresszáló *Arabidopsis* növények ozmotikus stresszel szemben érzékenyebbek a vad típusnál. Pontos szerepük azonban még nem tisztázott.

A ***QDr.OWB-6H*** régióba eső *GBR1052* markerhez tartozó EST szekvencia egy feltételezett rizs oligopeptidázzal mutatott hasonlóságot, amelynek a jelátviteli folyamatokban részt vevő fehérjemolekulák módosításában és lebontásában van szerepe (Barrett és Rawlings 1992). Abiotikus stressztűrésben betöltött funkciója nem ismert. Az általunk azonosított, 6H kromoszómán található régióba eső, korábban térképezett QTL-ek környezetében két dehydrin gént (*dh4* és *dh5*) is leírtak (Teulat *et al.* 2003). Az általunk azonosított EST szekvenciákkal ezeknek a géneknek a

szerepét nem tudtuk alátámasztani és egyéb, ebbe a régióba eső, igazoltan abiotikus stresszhez kapcsolható kandidált gént sem tudtunk azonosítani.

A ***QDr1.OWB-7H*** régióban található *GBR0074* markerhez kapcsolható szekvencia egy rizs gamma-purothionin protein, amely a védő funkcióval rendelkező növényi proteinekhez tartozik (*plant defense protein*). Mindemellett egy gamma purothionin fokozott expresszióját figyelték meg őszi búzában hidegedzés alatt (Gaudet *et al.* 2003), amely abiotikus stresszekben játszott szerepükre utal.

A ***QDr2.OWB-7H*** régió egyik jelölt génje egy szerin/threonin foszfatáz gén katalitikus alegységével (PP2Ac-2) mutatott erős homológiát. Egy abszcizinsav hiperszenzitív *Arabidopsis* mutáns (*pp2ac-2*) a vad típushoz képest lassabban csírázott és érzékenyebb volt ozmotikus stresszel szemben (Pernas *et al.* 2007), amely alapján arra következtettek, hogy ez az alegység az ABA-függő génexpresszió negatív szabályozásában vesz részt (Pernas *et al.* 2007). Ezzel szemben egy másik ABA hiperszenzitív mutáns (*era1*) jobb ozmotikus stressztűrést mutatott (Xiong *et al.* 2001). Ezek az eredmények jól jelzik, hogy az abszciznisav szerepe az abiotikus stresszválaszokban igen összetett, részleteiben azonban még nem ismert.

Annak ellenére, hogy a vizsgálataink során azonosított szekvenciák többsége irodalmi adatok alapján összefüggésbe hozható a szárazságtűréssel, az általunk meghatározott jelölt gének valódi szerepének tisztázásához további vizsgálatokra van szükség. A statisztikai megközelítések bizonytalansága (első, másodfajú hiba), valamit a fizikai térkép hiánya miatt a QTL klaszterek csúcspozíciójába még számos nem azonosított gén is valószínűsíthető. Így lehetséges például, hogy az általunk azonosított, több jelleget befolyásoló QTL-ek hatása nem azonos gének pleiotróp megnyilvánulásának, hanem szorosan kapcsolt különböző gének hatásának köszönhető, amelyek szétválasztása finom, illetve fizikai térképezéssel lehetséges.

4.9.5. Marker alapú szelekcióra felhasználható markerek

Árpában irodalmi adatok szerint már azonosítottak olyan markereket, amelyek vízhiányos környezetben termést befolyásoló QTL-ekhez kapcsoltak. Ezeknek a markereknek gyakorlati alkalmazhatóságát azonban ezidáig még nem bizonyították (von Korff *et al.* 2008). Az OWB populáción több fejlődési fázisban meghatározott QTL-ekből kiindulva szintén sikerült három olyan mikroszatellit markert azonosítanunk *(GBM1359, GBM1404* és *GBM1498)*, amelyek szárazságtűréssel kapcsolatba hozható régiókban helyezkednek el. Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, hogy ezek a markerek valóban használhatóak-e szárazságtűrő genotípusok szelekciójára, egy árpagyűjtemény fenotipizálását és a három markerrel történő genotipizálását is elvégeztük. A 39 fajtából és tájfajtából álló fajtagyűjteményen kapott eredmények azt mutatták, hogy a *GBM1359, GBM1404* és *GBM1498* markerek allélelosztása összefüggésben van a stressz

körülmények között mért terméseredményekkel. Mindhárom marker esetében az alléltípusok alapján képzett fenotípus csoportok termése stressz alatt szignifikánsan különbözött egymástól. Ezen kívül a *GBM1359* és a *GBM1498* markerek esetében a csíranövénykori hajtáshosszban is különbséget találtunk az egyes allélcsoportok között. Véleményünk szerint a kétallélos keresztezési populáción azonosított, szárazságtűrést meghatározó régiókhoz kapcsolt markerek hatékonyan használhatóak diverz genetikai alapanyagok szelekciójára is. Eredményeink alapján a *GBM1359, GBM1404* és *GBM1498* markereket alkalmasnak tartjuk szárazságtűrő genotípusok marker alapú szelekciójának elősegítésére.

4.10. Új tudományos eredmények

1. Árpa ozmotikus stressz és szárazságtűrését több egyedfejlődési fázisban befolyásoló lókuszok azonosítása

A megfelelő térképezési populáció kiválasztása után a növényi egyedfejődés három különböző fázisában: csíranövény, fiatalnövény és felnőtt korban több független ismétlésben és különböző vízhiányt modellező kísérleti beállítások mellett vizsgáltuk az OWB populáció 94 DH vonalát. A fenotípusos adatokat felhasználva QTL analízist végeztünk és összesen 38 QTL-t azonosítottunk, amelyek a hajtás és gyökérhosszt, hajtás száraztömeget, termésparamétereket és fiziológiai jellegeket befolyásolnak. Az egyedi QTL-ek összevetését követően öt olyan régiót tudtunk elkülöníteni, amelyeket legalább két egyedfejlődési fázisban is azonosítottunk és több, szárazságtűréssel kapcsolatos jelleget befolyásolnak. Ez az öt régió a 2H, 5H, 6H és a 7H kromoszómákon helyezkedik el. Ehhez kapcsolódóan igazoltuk, hogy bizonyos QTL-ek hatása a különböző egyedfejlődési fázisokban eltérő lehet, ami alátámasztja a szárazságtűrés egyedfejlődési fázis-specifikus jellegét.

2. Az azonosított QTL-ekhez tartozó kandidált gének meghatározása EST alapú térkép segítségével

Az általunk azonosított régiókban elhelyezkedő EST markerek szekvenciaadatainak felhasználásával megkerestük a legnagyobb egyezést mutató rizs homológokat. A jobban annotált rizs gének alapján következtetni tudtunk a QTL régiókba eső és jelenleg ismert gének/ EST szekvenciák lehetséges funkciójára. Vizsgálataink alapján meghatároztuk az öt régió legvalószínűbb jelölt génjeinek listáját, amelyek pontos szerepének igazolásához további vizsgálatokat tervezünk a jövőben.

3. Szárazságtűrő árpa genotípusok marker alapú szelekciójára felhasználható markerek azonosítása

Szárazságtűrési vizsgálatokat végeztünk egy 39 genotípusból álló fajtagyűjteményen abból a célból, hogy az OWB populáción kapott eredményeinket független genetikai háttérben is ellenőrizhessük. A három kiválasztott mikroszatellit markert genotipizáltuk a fajtagyűjteményen és kapcsolatot kerestünk a vizsgált markerek alléltípusa és a fenotípusos értékek eloszlása között. Mindhárom vizsgált marker esetében szignifikáns különbséget találtunk a különböző alléltípusba tartozó genotípusok kalászonkénti terméseredményeiben stressz körülmények között. Eredményeink alapján a *GBM1404, GBM1498* és a *GBM1359* markerek alkalmasak lehetnek

szárazságtűrő genotípusok marker alapú szelekciójára, azonban az eredmények nagyobb genetikai alapanyagon való megerősítését szükségesnek tartjuk.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Szárazságtűrési kísérleteink eredményei alapján a csíranövény és fiatalnövény korban kapott eredmények nem minden esetben vágnak egybe a felnőttkori tesztek eredményeivel. Mindebből következik, hogy az ozmotikus- és szárazságstressztűrés fejlődési fázis specifikus jelleg, és a stressztoleranciát befolyásoló lókuszok azonosításához több egyedfejlődési fázis és kísérleti beállítás vizsgálatára is szükség van.

A kétszülős térképezési populáción azonosított, szárazságtűréssel összefüggő régiók hatása eltérő genetikai háttérben, agronómiailag értékes vonalak esetén is igazolható volt. Ezek az eredmények véleményünk szerint elősegíthetik a marker alapú szelekció gyakorlati alkalmazhatóságát olyan komplex jelleg esetében is, mint a szárazságtűrés. Ahhoz azonban, hogy a jelen vizsgálatok eredményeképpen kiválasztott három mikroszatellit marker széleskörű felhasználhatóságát ténylegesen igazoljuk, nagyobb mennyiségű, agronómiailag is értékes árpa vonal vizsgálatát tartjuk szükségesnek.

Az OWB populáció genetikai térképén a markerek átlagos távolsága 1,8 cM és az azonosított lókuszok legvalószínűbb elhelyezkedését 0,0-5,9 cM pontossággal tudtuk megadni. Ez a tartomány az általunk azonosított jelölt géneken kívül még számos másik gént tartalmazhat, amelyek szintén felelősek lehetnek az általunk detektált fenotípusos hatásokért. Ezen kívül lehetséges, hogy az általunk azonosított, több jelleget befolyásoló QTL-ek hatása nem azonos gének pleiotróp megnyilvánulásának, hanem szorosan kapcsolt különböző gének hatásának köszönhető. Ezen potenciális gének / lókuszok szétválasztása, illetve annak meghatározása, hogy az általunk azonosított régiók pontosan mekkora fizikai távolságot jelentenek és hány gént tartalmaznak, az árpa fizikai térképének elkészülte után lehetséges.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A szárazságtűrés komplex, mennyiségi tulajdonság, mely hazánkban a termésstabilitás egyik fontos eleme. A csapadék mennyiségében és eloszlásában Magyarországon évről-évre nagy különbségek mutatkoznak és a gabonafélék vegetációs periódusának végén tapasztalható szárazság mellett a tavaszi csapadék hiánya is egyre gyakoribb.

Egy adott genotípus vízhiányra adott válasza nagyban függ a növény korától, a stressz időtartamától és mértékétől, ezért a megbízhatóan toleráns genotípusok szelektálása vagy előállítása időigényes és nagy körültekintést kívánó feladat. A szárazságtűrés genetikai háttere az intenzív kutatások ellenére sem teljesen ismert, ezért toleráns genotípusok szelektálására gyakran a termésen alapuló szelekció a legcélravezetőbb. A szárazságtűrés genetikai hátterének, illetve a vízhiány alatti termésképzésben szerepet játszó géneknek a megismerése elősegítheti a szárazságtűrés marker alapú szelekciós rendszerének kidolgozását és megkönnyítheti a toleráns genotípusok előállítását.

A mennyiségi jellegek elfogadott vizsgálati módszere a QTL analízis. A QTL-ek kimutathatóságát és fenotípusos hatásának nagyságát azonban a környezet jelentős mértékben befolyásolja. A szárazságtűrés kísérletes tesztelésére számos, irodalomban fellelhető megközelítés létezik, de a jelleg komplexitása és a hosszú, költséges felnőttkori tesztelések miatt az alapkutatással foglalkozó csoportok főként korai egyedfejlődési fázisokban végeznek fenotípusos vizsgálatokat. Sajnos ezek az adatok általában nem nyújtanak megbízható információt a felnőttkori toleranciáról és a termésparaméterekről. Az ilyen jellegű eredmények ezért nehezen, vagy gyakran egyáltalán nem hasznosulhatnak az alkalmazott kutatásban. Munkánk során megpróbáltunk természetszerű, a szárazságtűrést teljes komplexitásában modellezni képes kísérleti beállításokat is alkalmazni, amely időszerű molekuláris genetikai és statisztikai megközelítésekkel együtt új, alkalmazott kutatásban is hasznosítható eredményeket szolgáltathatnak.

Munkánk során előkísérleteket végeztünk négy árpa térképezési populáció szülői vonalain (Oregon Wolfe Barley: ‘DOM’×‘REC’, ‘Steptoe’×‘Morex’, ‘Brenda’×‘HS213’, ‘Brenda’×‘HS584’) és ezek alapján az OWB populációt választottuk ki szárazságtűréssel kapcsolatos jellegek térképezésére. A vizsgálatokat három egyedfejlődési fázisban (csíranövény, fiatalnövény és felnőtt korban) vízkultúrás és talajos kísérleti rendszerben végeztük el. Célul tűztük ki, hogy szárazságtűrésben szerepet játszó genomi régiókat azonosítsunk és nagy számú, független, eltérő kísérleti környezetből származó adatokból kiindulva nagy sűrűségű genetikai térkép használatával maximalizáljuk eredményeink pontosságát. Mivel vizsgálatainkat több egyedfejlődési fázisban végeztük el, az egyes fejlődési fázisokra specifikus és általános QTL-ek elkülönítése is lehetségessé vált. Ezen kívül az OWB populáció EST alapú markereket tartalmazó funkcionális

térképének segítségével az általunk azonosított régiók lehetséges funkciójára is tudtunk következteni.

Eredményeink alapján öt, a 2H, 5H, 6H és a 7H kromoszómán található QTL-klasztert azonosítottunk, amelyek mindegyike több szárazságtűréssel kapcsolatos jelleget legalább két egyedfejlődési fázisban befolyásol. A jellegek előfordulásának valószínűségi maximumába eső EST markerek szekvenciája alapján az öt régió jelölt génjeit is meghatároztuk. A 2H-án többek között egy DREB2F protein homológot és egy papain-szerű cisztein proteinázt, az 5H-án egy aldehid dehidrogenázt, a 6H-án egy oligopeptidázt, a 7H-án pedig egy gamma purotionin családba tartozó fehérjét, valamint egy szerin/threonin protein foszfatáz katalitikus alegység homológot is azonosítottunk.

Mivel kíváncsiak voltunk arra is, hogy az OWB populáción azonosított régiók eltérő genetikai háttérben is összefüggnek-e a szárazságtűréssel, és elősegíthetik-e a marker alapú szelekciót, az azonosított régiókban található SSR markerek hatását 39 tavaszi árpa genotípuson is megvizsgáltuk. A vonalak geno- és fenotipizálását követően kapcsolatot kerestünk a vizsgált markerek allétípusa és a fenotípusos eloszlás között.

A *GBM1404, GBM1498* és a *GBM1359* markerek esetében szignifikáns különbséget találtunk a különböző alléltípusba tartozó genotípusok kalászonkénti terméseredményében stressz körülmények között. A másik két régióban sajnos nem találtunk közel eső mikroszatellit alapú markert, ezért ezeket nem vizsgáltuk. Az általunk azonosított három markert jó jelöltnek tartjuk a szárazságtűrés marker alapú szelekciójára, azonban az eredmények nagyobb növényanyagon való megerősítését szükségesnek tartjuk.

8. SUMMARY

Drought tolerance is a complex quantitative trait and is one of the most important components of yield stability in Hungary, where there are great fluctuations in the quantity and distribution of rainfall each year. In addition to drought at the end of the cereal vegetation period, rainfall deficiency in spring is becoming increasingly frequent.

The response of a given genotype to water deficiency depends greatly on the age of the plant and on the duration and extent of stress, so the selection or development of genotypes with reliable tolerance is both time-consuming and complex. The genetic background of drought tolerance has still not been completely clarified, despite intensive research efforts, so the best way to select for tolerant genotypes is often to select for yield. The identification of genes involved in drought tolerance, or in yield formation during water deficit, could promote the elaboration of a marker-based selection system for drought tolerance and could facilitate the development of tolerant genotypes.

QTL analysis is a widely used method for investigating quantitative traits. However, the detectability of QTLs and the magnitude of phenotypic effects are greatly influenced by the environment. Numerous approaches have been reported in the literature for the empirical testing of drought tolerance, but due to the complexity of the trait and the time and expense involved in testing in the adult stage, most basic research consists of phenotypic analysis in early stages of plant development. Unfortunately, the data obtained do not provide reliable information on adult tolerance and yield parameters, so they can only be utilised with difficulty, if at all, in applied research. The aim of this work was thus to elaborate realistic experimental scenarios capable of modelling the full complexity of drought tolerance, which – in combination with up-to-date molecular genetic and statistical approaches – could generate new results applicable in applied research.

Preliminary experiments were carried out on the parental lines of four barley mapping populations (Oregon Wolfe Barley: ‘DOM’ × ‘REC’, ‘Steptoe’ × ‘Morex’, ‘Brenda’ × ‘HS213’, ‘Brenda’ × ‘HS584’), on the basis of which the OWB population was chosen for the mapping of traits related to drought tolerance. Tests were made in three stages of development (germination, seedling and adult stage) in both hydroponics and soil cultures. The aim was to identify genomic regions involved in drought tolerance and to maximise the accuracy of the results by using a high density genetic map based on a large number of data originating from independent, diverse experimental environments. As the studies involved several phases of plant development, it was also possible to detect specific and general QTLs for the individual developmental phases. In

addition, the functional maps compiled for the OWB population using EST-based markers allowed conclusions to be drawn on the possible functions of the regions identified.

On the basis of the results, five QTL clusters were identified on chromosomes 2H, 5H, 6H and 7H, all of which influenced several traits related to drought tolerance in at least two phases of development. Based on the closest EST marker sequences list of candidate genes for the five regions were also identified. These included a DREB2F protein homologue and a papaine-like cysteine proteinase on chromosome 2H, an aldehyde dehydrogenase on 5H, an oligopeptidase on 6H, and a protein belonging to the gamma purothionin family and a serine/threonine protein phosphatase catalytic sub-unit homologue on 7H.

In order to decide whether the regions identified in the OWB population were related to drought tolerance in other genetic backgrounds and whether they could be utilised for marker-based selection, the effect of the SSR markers located in the identified regions was tested on 39 spring barley genotypes. After genotyping and phenotyping the lines, relationships were sought between the allele types of the markers and the phenotypic distribution.

Significant differences were found in the case of markers *GBM1404, GMB1498* and *GBM1359* between the yield/spike data of genotypes belonging to different allele types under stress conditions. Unfortunately no microsatellite markers were found in the peak region of the other two QTL clusters, so these could not be tested. The three markers identified appear to be good candidates for the marker-based selection of drought tolerance, but the results need to be confirmed on a wider range of plant material.

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

ASSMANN S.M., HAUBRICK L.L. (1996): Transport proteins of the plant plasma membrane. *Current Opinion in Cell Biology*, (8) 458-467. p.

BAJJI M., LUTTS S., KINET J.M. (2001): Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science*, (160) 669-681. p.

BAHIELDIN A., MAHFOUZ H.T., EISSA H.F., SALEH O.M., RAMADAN A.M., AHMED I.A., DYER W.E., EL-ITRIBY H.A., MADKOUR M.A. (2005): Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. *Physiologia Plantarum* (123**)** 421-427. p.

BARRS H.D., WATHERLEY P.E. (1962): A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Science* (15) 413-428. p.

BARRETT A.J., RAWLINGS N.D. (1992): Oligopeptidases, and the emergence of the prolyl oligopeptidase family. (373) 353-360. p. In: *Biological chemistry hoppe-seyler.* Berlin: Walter De Gruyter & Co.

BAUM M., GRANDO S., BACKES G., JAHOOR A., SABBAGH A., CECCARELLI S. (2003): QTLs for agronomic traits in the mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross 'Arta' x *H-spontaneum* 41-1. *Theoretical and Applied Genetics*, (107) 1215-1225. p.

BENETT M.D., LEITCH I.J. (2003): Angiosperm DNA C-values database (release 6.0, Oct. 2005) http://www.kew.org/cvalues/

BLUM A., SHPILER L., GOLAN G., MAYER J., SINMENA B. (1991): Mass selection of wheat for grain filling without transient photosynthesis. *Euphytica*, (54) 111-116. p.

BLUM A. (2005): Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research,* (56**)** 1159-1168. p.

BOYER J.S. (1982): Plant productivity and environment. *Science*, (218) 443-448. p.

BRAY E.A. (1997): Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, (2) 48-54. p.

CARBONELL E.A., ASINS M.J., BASELGA M., BALANSARD E., GERIG T.M. (1993): Power studies in the estimation of genetic-parameters and the localization of quantitative trait loci for backcross and doubled haploid populations. *Theoretical and Applied Genetics*, (86) 411-416. p.

CECCARELLI S. (1987): Yield potential and drought tolerance of segregating populations of barley in contrasting environments. *Euphytica*, (36) 265-273. p.

CHEE M., YANG R., HUBBELL E., BERNO A., HUANG X.C., STERN D., WINKLER J., LOCKHART D.J., MORRIS M.S., FODOR S.P.A. (1996): Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science*, (274) 610-614. p.

CHEN F.Q., HAYES P.M. (1989): A comparison of *Hordeum bulbosum*-mediated haploid

production efficiency in barley using invitro floret and tiller culture. *Theoretical and Applied Genetics*, (77) 701-704. p.

CHERIAN S., REDDY M.P., FERREIRA R.B. (2006): Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. *Biologia Plantarum* (50) 481-495. p.

CHURCILL G.A., DOERGE R.W. (1994): Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics,* (138) 963-971. p.

CLOSE T.J. (1996): Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, (97) 795-803. p.

CLOSE T.J., WANAMAKER S.I., CALDO R.A., TURNER S.M., ASHLOCK D.A., DICKERSON J.A., WING R.A., MUEHLBAUER G.J., KLEINHOFS A., WISE R.P. (2004): A new resource for cereal genomics: 22k barley genechip comes of age. *Plant Physiology*, (134) 960-968. p.

COSTA J.M., COREY A., HAYES P.M., JOBET C., KLEINHOFS A., KOPISCH-OBUSCH A., KRAMER S.F., KUDRNA D., LI M., RIERA-LIZARAZU O., SATO K., SZUCS P., TOOJINDA T., VALES M.I., WOLFE R.I. (2001): Molecular mapping of the Oregon Wolfe barleys: A phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, (103) 415-424. p.

CUI X.H., HAO F.S., CHEN H., CHEN J., WANG X.C. (2008): Expression of the vicia faba vfpip1 gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *Journal of Plant Research*, (121) 207-214. p.

CSEUZ L. (1990): Őszi búzák (*Triticum aestivum* L) tesztelése szárazságtűrésre egyszerű laboratóriumi módszerekkel. *Növénytermelés,* (3) 227-233. p.

CSEUZ L. (2009): A szárazságtűrő őszi búza (*Triticum aestivum* L.) nemesítésének lehetőségei és korlátai. Doktori értekezés, Szent István Egyem

DIAB A.A., TEULAT-MERAH B., THIS D., OZTURK N.Z., BENSCHER D., SORRELLS M.E. (2004): Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theoretical and Applied Genetics,* (109) 1417-1425. p.

DUBOUZET J.G., SAKUMA Y., ITO Y., KASUGA M., DUBOUZET E.G., MIURA S., SEKI M., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2003): OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal,* (33) 751-763. p.

EDWARDS M.D., STUBER C.W., WENDEL J.F. (1987): Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and type of gene action. *Genetics,* (116) 113-125. p.

FALCONER D.S., MACKAY T.F.C., (1996) Introduction to quantitative genetics. Essex: Pearson Education Limited. 464. p.

FEUILLET C., KELLER B. (2002): Comparative genomics in the grass family: Molecular characterization of grass genome structure and evolution. *Annals of Botany*, (89) 3-10. p.

GALIBA G., KOCSY G., KAUR-SAWHNEY R., SUTKA J., GALSTON A.W. (1993): Chromosomal localization of osmotic and salt stress-induced differential alterations in polyamine content in wheat. *Plant Science*, (92) 203-211. p.

GALIBA G. (2002): Mapping of genes regulating abiotic stress tolerance in cereals. *Acta Agronomica Hungarica*, (50) 235-247. p.

GALSTON A.W., SAWHNEY R.K. (1990): Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology*, (94) 406-410. p.

GAUDET D.A., LAROCHE A., FRICK M., HUEL R., PUCHALSKI B. (2003): Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum*, (117) 195-205. p.

GRANER A., JAHOOR A., SCHONDELMAIER J., SIEDLER H., PILLEN K., FISCHBECK G., WENZEL G., HERRMANN R.G. (1991): Construction of an RFLP map of barley. *Theoretical and Applied Genetics*, (83) 250-256. p.

GROPPA M.D., BENAVIDES M.P. (2008): Polyamines and abiotic stress: Recent advances. *Amino Acids*, (34) 35-45. p.

GUPTA P.K., VARSHNEY R.K. (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, (113) 163-185. p.

HAI L., GUO H.J., WAGNER C., XIAO S.H., FRIEDT W. (2008): Genomic regions for yield and yield parameters in chinese winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes tested under varying environments correspond to QTL in widely different wheat materials. *Plant Science*, (175) 226-232. p.

HALDANE J.B.S. (1919): The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J Genet,* (8) 299-309. p.

HALEY C.S., KNOTT S.A. (1992): A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity,* (69) 315-324. p.

HARE P.D., CRESS W.A.,VAN STADEN J. (1998): Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment*, (21) 535-553. p.

HEUN M., KENNEDY A.E., ANDERSON J.A., LAPITAN N.L.V., SORRELLS M.E., TANKSLEY S.D. (1991): Construction of a restriction-fragment-length-polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, (34) 437-447. p.

HINCHA D.K., HAGEMANN M. (2004): Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal*, (383) 277-283. p.

HUANG J., HIRJI R., ADAM L., ROZWADOWSKI K.L., HAMMERLINDL J.K., KELLER W.A., SELVARAJ G. (2000): Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: Metabolic limitations. *Plant Physiology*, (122) 747-756. p.

JANSEN R.C. (1993): Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics,* (135) 205-211. p.

JANSEN R.C. (1996): Comlpex plant traits: time for polygenic analysis. *Trends in Plant Science,* (1) 89-94. p.

JENSEN J. (1974): Chromosome doubling techniques in haploids. In: KASHA K.J. (Szerk.) *Haploids in Higher Plants. Advances and Potential. Proceedings of the First International Symposium*, Guelph University Press, pp. 153–190.

JUNG H.W., LIM C.W., LEE S.C., CHOI H.W., HWANG C.H., HWANG B.K. (2008): Distinct roles of the pepper hypersensitive induced reaction protein gene cahir1 in disease and osmotic stress, as determined by comparative transcriptome and proteome analyses. *Planta*, (227) 409-425. p.

KAMELI A., LÖSEL D.M. (1995): Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water-stress. *Journal of Plant Physiology*, (145) 363-366. p.

KAO C.H. (2000): On the differences between maximum likelihood and regression interval mapping in the analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, (156) 855-865. p.

KAO C.H., ZENG Z.B., TEASDALE R.D. (1999): Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics*, (152) 1203-1216. p.

KEARSEY M.J., FARQUHAR A.G.L. (1998): QTL analysis in plants; Where are we now? *Heredity,* (80) 137-142. p.

KIRIGWI F.M., VAN GINKEL M., BROWN-GUEDIRA G., GILL B.S., PAULSEN G.M.,FRITZ A.K. (2007): Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Molecular Breeding*, (20) 401-413. p.

KISHOR P.B.K., HONG Z.L., MIAO G.H., HU C.A.A., VERMA D.P.S. (1995): Overexpression of delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, (108) 1387-1394. p.

KLEINHOFS A., KILIAN A., MAROOF M.A.S., BIYASHEV R.M., HAYES P., CHEN F.Q., LAPITAN N., FENWICK A., BLAKE T.K., KANAZIN V., ANANIEV E., DAHLEEN L., KUDRNA D., BOLLINGER J., KNAPP S.J., LIU B., SORRELLS M., HEUN M., FRANCKOWIAK J.D., HOFFMAN D., SKADSEN R., STEFFENSON B.J. (1993): A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, (86) 705-712. p.

KOAG M.C., FENTON R.D., WILKENS S., CLOSE T.J. (2003): The binding of maize dhn1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology*, (131) 309-316. p.

KOBILJSKI B, DENCIC S., HRISTOV N., MLADENOV N., QUARRIE S., STEPHENSON P., KIRBY J. (2007): Potential uses of microsatellites in marker-assisted selection for improved grain yield in wheat. In.: BUCK H.T. (Szerk.) *Wheat production in stressed environments.* Springer, pp. 729-736.

KOCSY G., GALIBA G., BRUNOLD C. (2001): Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* (113) 158-164. p.

KOCSY G., SZALAI G., GALIBA G. (2004): Effect of osmotic stress on glutathione and hydroxymethylglutathione accumulation in wheat. *Journal of Plant Physiology*, (161) 785-794. p.

KOIZUMI M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., TSUJI H., SHINOZAKI K. (1993): Structure and expression of 2 genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene,* (129) 175-182. p.

KOSAMBI D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175. p.

KRAMER P.J., BOYER J.S. (1995): Water relations of Plants and Soils. San Diego: Academic Press. pp. 482.

LANDER E.S., BOTSTEIN D. (1989): Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics,* (129) 185-199. p.

LELLEY J. (1963): A nemesítés módszerei. In.: LELLEY Y., MÁNDY GY. (Szerk.): *A búza-Triticum aestivum L*. Kultúrflóra sorozat 19. Budapest: Akadémiai Kiadó, pp. 233-240.

LEVINSON G., GUTMAN G.A. (1987): Slipped-strand mispairing - a major mechanism for DNA-sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, (4) 203-221. p.

LEVITT L. (1980): Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic Press. 697 p.

LI J., HUANG X.Q., HEINRICHS F., GANAL M.W., RODER M.S. (2005): Analysis of QTLs for yield, yield components, and malting quality in a DC3-DH population of spring barley. *Theoretical and Applied Genetics*, (110) 356-363. p.

LI J.Z., HUANG X.Q., HEINRICHS F., GANAL M.W., RODER M.S. (2006): Analysis of QTLs for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advanced backcross population of spring barley. *Genome*, (49) 454-466. p.

LILLEY J.M., LUDLOW M.M., MCCOUCH S.R., OTOOLE J.C. (1996): Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, (47) 1427-1436. p.

LIU K., LI L.G., LUAN S. (2006): Intracellular K+ sensing of skor, a shaker-type K+ channel from *Arabidopsis*. *Plant Journal*, (46) 260-268. p.

LUO Z.W., WU C.I., KEARSEY M.J. (2002): Precision and high-resolution mapping of quantitative trait loci by use of recurrent selection, backcross or intercross schemes. *Genetics*, (161) 915-929. p.

MACCAFERRI M., SANGUINETI M.C., CORNETI S., ORTEGA J.L.A., BEN SALEM M., BORT J., DEAMBROGIO E., DEL MORAL L.F.G., DEMONTIS A., EL-AHMED A., MAALOUF F., MACHLAB H., MARTOS V., MORAGUES M., MOTAWAJ J., NACHIT M., NSERALLAH N., OUABBOU H., ROYO C., SLAMA A., TUBEROSA R. (2008): Quantitative trait loci for grain yield and adaptation of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) across a wide range of water availability. *Genetics*, (178) 489-511. p.

MAHDIEH M., MOSTAJERAN A., HORIE T., KATSUHARA M. (2008): Drought stress alters water relations and expression of pip-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant and Cell Physiology*, (49) 801-813. p.

MARCEL T.C., VARSHNEY R.K., BARBIERI M., JAFARY H., DE KOCK M.J.D., GRANER A., NIKS R.E. (2007): A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theoretical and Applied Genetics*, (114) 487-500. p.

MEYER A.J. (2008): The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology*, (165) 1390-1403. p.

MITTLER R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, (7) 405-410. p.

MORGAN J.M. (1991): A gene controlling differences in osmoregulation in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, (18) 249-257. p.

MURPHY R., ORTEGA J.K.E. (1995): A new pressure probe method to determine the average volumetric elastic-modulus of cells in plant-tissue. *Plant Physiology*, (107) 995-1005. p.

NADIMPALLI R., YALPANI N., JOHAL G.S., SIMMONS C.R. (2000): Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *Journal of Biological Chemistry*, (275) 29579-29586.p.

NGUYEN T.T.T., KLUEVA N., CHAMARECK V., AARTI A., MAGPANTAY G., MILLENA A.C.M., PATHAN M.S., NGUYEN H.T. (2004): Saturation mapping of QTL regions and identification of putative candidate genes for drought tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, (272) 35-46. p.

OZTURK Z.N., TALAME V., DEYHOLOS M., MICHALOWSKI C.B., GALBRAITH D.W., GOZUKIRMIZI N., TUBEROSA R., BOHNERT H.J. (2002): Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology,* (48): 551-573. p.

PASSIOURA J.B. (1996): Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation,* (20) 79-83. p.

PEIGHAMBARI S.A., SAMADI B.Y., NABIPOUR A., CHARMET G., SARRAFI A. (2005): QTL analysis for agronomic traits in a barley doubled haploids population grown in iran. *Plant Science*, (169) 1008-1013. p.

PERNAS M., GARCIA-CASADO G., ROJO E., SOLANO R., SANCHEZ-SERRANO J.J. (2007): A protein phosphatase 2a catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant Journal*, (51) 763-778. p.

PILONSMITS E.A.H., EBSKAMP M.J.M., PAUL M.J., JEUKEN M.J.W., WEISBEEK P.J., SMEEKENS S.C.M. (1995): Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology*, (107) 125-130. p.

PLASCHKE J., GANAL M.W., RODER M.S. (1995): Detection of genetic diversity in closely-related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, (91) 1001-1007. p.

PRICE A.H. (2006): Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends in Plant Science*, (11) 213-216. p.

REYNOLDS M., CALDERINI D., CONDON A.,VARGAS M. (2007): Association of source/sink traits with yield, biomass and radiation use efficiency among random sister lines from three wheat crosses in a high-yield environment. *Journal of Agricultural Science* (145) 3-16. p.

ROYO C., BLANCO R. (1998): Use of potassium iodide to mimic drought stress in triticale. *Field Crops Research*, (59) 201-212. p.

RÖDER M.S., KORZUN V., GILL B.S., GANAL M.W. (1998): The physical mapping of microsatellite markers in wheat. *Genome*, (41) 278-283. p.

RÖDER M.S., LAPITAN N.L.V., SORRELLS M.E., TANKSLEY S.D. (1993): Genetic and physical mapping of barley telomeres. *Molecular & General Genetics*, (238) 294-303. p.

RÖDER M.S., PLASCHKE J., KONIG S.U., BORNER A., SORRELLS M.E., TANKSLEY S.D., GANAL M.W. (1995): Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular & General Genetics*, (246) 327-333. p.

SAMARAH N.H., ALQUDAH A.M., AMAYREH J.A., MCANDREWS G.M. (2009): The effect of late-terminal drought stress on yield components of four barley cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, (195) 427-441. p.

SAX K. (1923): The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris. Genetics* (8) 552-560. p.

SCHMALENBACH I., KORBER N., PILLEN K. (2008): Selecting a set of wild barley introgression lines and verification of QTL effects for resistance to powdery mildew and leaf rust. *Theoretical and Applied Genetics*, (117) 1093-1106. p.

SEKI M., UMEZAWA T., URANO K., SHINOZAKI K. (2007): Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, (10) 296-302. p.

SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SEKI M. (2003): Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, (6) 410-417. p.

SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2007): Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany,* (58) 221-227. p.

SNAPE J.W., WRIGHT A.J., SIMPSON E. (1984): Methods for estimating gene numbers for quantitative characters using doubled haploid lines. *Theoretical and Applied Genetics*, (67) 143-148. p.

STEIN N., PRASAD M., SCHOLZ U., THIEL T., ZHANG H.N., WOLF M., KOTA R., VARSHNEY R.K., PEROVIC D., GROSSE I., GRANER A. (2007): A 1,000-loci transcript map of the barley genome: New anchoring points for integrative grass genomics. *Theoretical and Applied Genetics*, (114) 823-839. p.

STURT E. (1975): Use of LOD scores for determination of order of loci on a chromosome. *Annuals of Human Genetics*, (39) 255-260. p.

SUNKAR R., BARTELS D., KIRCH H.H. (2003): Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal*, (35) 452-464.p.

SZŰCS P., BLAKE V.C., BHAT P.R, CHAO S., CLOSE T.J., CUESTA-MARCOS A., MUEHLBAUER G.J., RAMSAY L., WAUGH R., HAYES P.M. (2009): An integrated rescource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *The Plant Genome,* (2) 134-140. p.

TALAME V., SANGUINETI M.C., CHIAPPARINO E., BAHRI H., BEN SALEM M., FORSTER B.P., ELLIS R.P., RHOUMA S., ZOUMAROU W., WAUGH R., TUBEROSA R. (2004): Identification of *Hordum spontaneum* QTL alleles improving field performance of barley grown under rainfed condition. *Annuals and Applied Biology*, (144) 309-319. p

TALAME V., OZTURK N.Z., BOHNERT N.J., TUBEROSA R. (2007): Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany*, (58) 229-240. p.

TARCZYNSKI M.C., JENSEN R.G., BOHNERT H.J. (1993): Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, (259) 508-510. p.

TEULAT B., THIS D., KHAIRALLAH M., BORRIES C., RAGOT C., SOURDILLE P., LEROY P., MONNEVEUX P., CHARRIER A. (1998): Several QTLs involved in osmotic adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, (96) 688-698. p.

TEULAT B., BORRIES C., THIS D. (2001a): New QTLs identified for plant water status, water-soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theoretical and Applied Genetics*, (103) 161-170. p.

TEULAT B., MERAH O., SOUYRIS I., THIS D. (2001b): QTLs for agronomic traits from a mediterranean barley progeny grown in several environments. *Theoretical and Applied Genetics*, (103) 774-787. p.

TEULAT B., MERAH O., SIRAULT X., BORRIES C., WAUGH R., THIS D. (2002): QTLs for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. *Theoretical and Applied Genetics*, (106) 118-126. p.

TEULAT B., ZOUMAROU-WALLIS N., ROTTER B., BEN SALEM M., BAHRI H., THIS, D. (2003): QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments. *Theoretical and Applied Genetics,* (108**):** 181-188. p.

TISCHNER T., KŐSZEGI B., VEISZ O. (1996): Climatic programmes used in the Martonvásár phytotron most frequently in recent years. *Acta Agronomica Hungarica,* (45) 85-104. p.

TONDELLI A., FRANCIA E., BARABASCHI D., APRILE A., SKINNER J.S., STOCKINGER E.J., STANCA A.M., PECCHIONI N. (2006): Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theoretical and Applied Genetics,* (112) 445-454. p.

TUBEROSA R., SANGUINETI M. C., LANDI P., SALVI S., CASARINI E., CONTI S. (1998): RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics,* (97**)** 744-755. p.

TUBEROSA R., SALVI S. (2006): Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science*, (11) 405-412. p.

TYERMAN S.D., BOHNERT H.J., MAUREL C., STEUDLE E.,SMITH J.A.C. (1999): Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany,* (50) 1055-1071. p.

VAN OOIJEN J.W. (2004) MapQTL ® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

VARSHNEY R.K., GROSSE I., HAHNEL U., SIEFKEN R., PRASAD M., STEIN N., LANGRIDGE P., ALTSCHMIED L., GRANER A. (2006): Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non-uniform distribution of genes in the barley genome. *Theoretical and Applied Genetics*, (113) 239-250. p.

VARSHNEY R.K., MARCEL T.C., RAMSAY L., RUSSEL J., RODER M.S., STEIN N., WAUGH R., LANGRIDGE P., NIKS R.E., GRANER A. (2007): A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics,* (114) 1091-1103. p.

VENUPRASAD R., DALID C.O., DEL VALLE M., ZHAO D., ESPIRITU M., STA CRUZ T.M., AMANTE M., KUMAR A., ATLIN N.G. (2009): Identification and characterization of large-effect quantitative trait loci for grain yield under lowland drought stress in rice using bulk-segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, (120) 177-190. p.

VERSLUES P.E., AGARWAL M., KATIYAR-AGARWAL S., ZHU J., ZHU J.K. (2006): Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, (46) 1092-1092. p.

VON KORFF M., GRANDO S., DEL GRECO A., THIS D., BAUM M., CECCARELLI S. (2008): Quantitative trait loci associated with adaptation to mediterranean dryland conditions in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, (117) 653-669. p.

WASILEWSKA A., VLAD F., SIRICHANDRA C., REDKO Y., JAMMES F., VALON C., FREY N.F.D., LEUNG J. (2008): An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*, (1) 198-217. p.

WENZL P., LI H.B., CARLING J., ZHOU M.X., RAMAN H., PAUL E., HEARNDEN P., MAIER C., XIA L., CAIG V., OVESNA J., CAKIR M., POULSEN D., WANG J.P., RAMAN R., SMITH K.P., MUEHLBAUER G.J., CHALMERS K.J., KLEINHOFS A., HUTTNER E., KILIAN A. (2006): A high-density consensus map of barley linking dart markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *Bmc Genomics*, (7) p.

WOLFE R.I., FRANCKOWIAK J.D. (1991): Multiple dominant and recessive marker stocks in spring barley. *Barley Genetic Newsletter,* (20) 117-121. p.

XIONG L.M., ISHITANI M., LEE H., ZHU J.K. (2001): The *Arabidopsis* los5/aba3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*, (13) 2063-2083. p.

XU D.P., DUAN X.L., WANG B.Y., HONG B.M., HO T.H.D., 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* (110) 249-257. p.

YANCEY P.H., CLARK M.E., HAND S.C., BOWLUS R.D., SOMERO G.N. (1982): Living with water-stress - evolution of osmolyte systems. *Science*, (217) 1214-1222. p.

YANG J., ZHU J. (2005): Methods for predicting superior genotypes under multiple environments based on qtl effects. *Theoretical and Applied Genetics*, (110) 1268-1274. p.

YU Y., TOMKINS J.P., WAUGH R., FRISCH D.A., KUDRNA D., KLEINHOFS A., BRUEGGEMAN R.S., MUEHLBAUER G.J., WISE R.P., WING R.A. (2000): A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, (101) 1093-1099. p.

ZENG Z.B. (1994): Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics,* (136) 1457-1468. p.

ZHANG J.X., NGUYEN H.T., BLUM A. (1999): Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany*, (50) 291-302. p.

ZHANG J.X., KIRKHAM M.B. (1994): Drought-stress-induced changes in activities of superoxide-dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology*, (35) 785-791. p.

M2. Genomi DNS izolálásának módszere a mikroszatellit analízishez

1,5 - 2 hetes növény apróra vágott fiatal levelét 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, melyhez 200 µl frissen készített extrakciós puffert (100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1,25 % SDS, 0,38 % $Na_2S_2O_5$) adtunk. Homogenizálás után további 60 ^oC-os 500 µl extrakciós puffert adtunk a mintákhoz, majd ismételt óvatos homogenizálást követően 30 percig inkubáltuk 60 ^oC-os vízfürdőben. Ezt követően a fehérjék kicsapásához 700 µl kloroform-izoamil alkohol (24:1 V/V) elegyét adtuk hozzá, homogenizáltuk, majd centrifugáltuk 15 percig 10 000-es fordulaton. A felülúszót másik Eppendorf csőbe pipettáztuk és 1,4 ml -20 ^oC-os 96 %-os etanolt (EtOH) adtunk hozzá, mely a DNS-t kicsapta. Ezután 15 percig centrifugáltuk 10 000-es fordulaton. A centrifugálás után a felülúszót leöntöttük, a DNS csapadékot 1 ml 70 %-os -20 ^oC-os etanollal mostuk, majd ismét centrifugáltuk 5 percig, 10 000 prm fordulaton. A centrifugálás után az felülúszót leöntöttük, a csapadékot vákuum alatt szárítottuk, majd 50 µl autoklávozott MilliQ vízben feloldottuk. A DNS mintákat -20 ^oC-on tároltuk. A mikroszatellit analízishez a DNS-t 50-100 ng/µl koncentrációra hígítottuk.

M3. Mikroszatellit analízis PCR reakcióinak körülményei

A polimeráz láncreakciót 20 µl végtérfogatban végeztük el, melynek összetétele a következő volt:

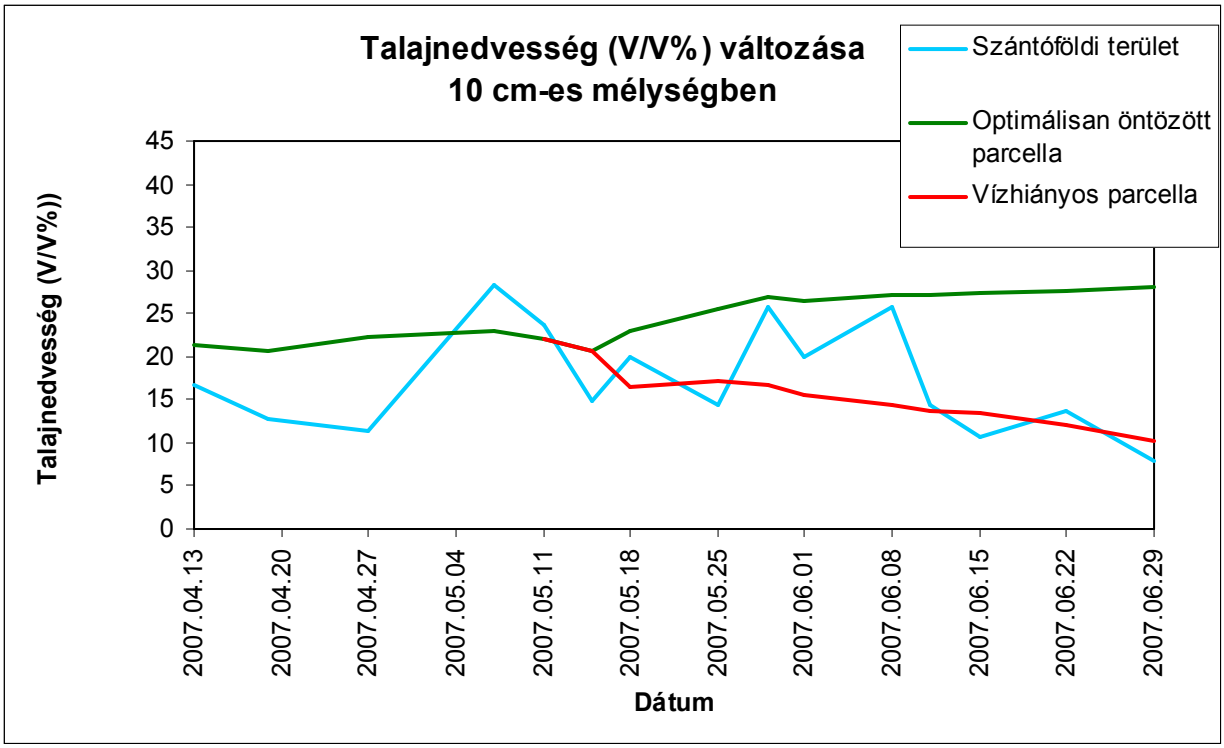
2 µl	árpa genomikus DNS (kb. 100-200 ng)
4 µl	5 x *GoTaq*® PCR puffer (1 M Tris-HCl, 1 M KCl,)
1,2 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
0,4 µl	dNTPs (2,5 mM)
0,4 – 0,4 µl	L (bal) és R (jobb) primer (100 nM)
0,15 µl	*GoTaq*® DNS polimeráz (Promega)
11,45 µl	H_2O

Az analízishez GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) PCR készülékeket használtuk. 3 perc 94 ^oC-ra történő melegítés után 45 ciklust futtatunk, melyek 1 perc 94 ^oC-os, 1 perc 50, 55 vagy 60 ^oC-os (primerpártól függően) és egy 2 perc 72 ^oC-os lépésből álltak. A 45 ciklust egy 10 perces 72 ^oC-os extenziós lépés követte.

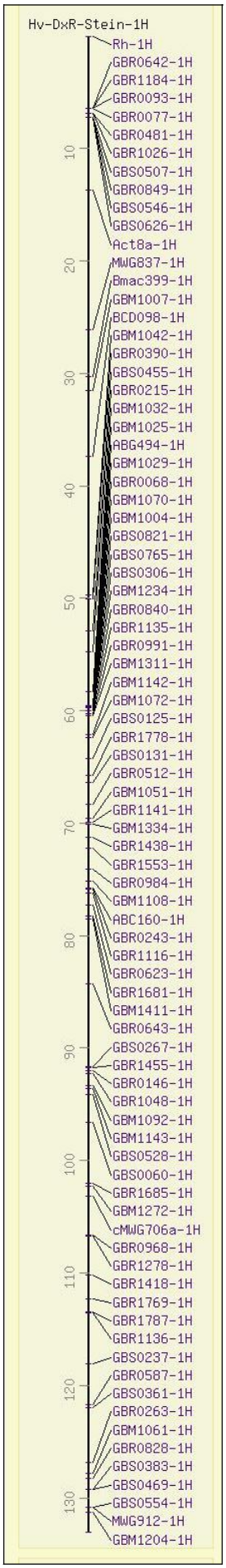
M4. A *GBM1359, GBM1404* és a *GBM1498* markerek árpagyűjteményben azonosított alléltípusai.

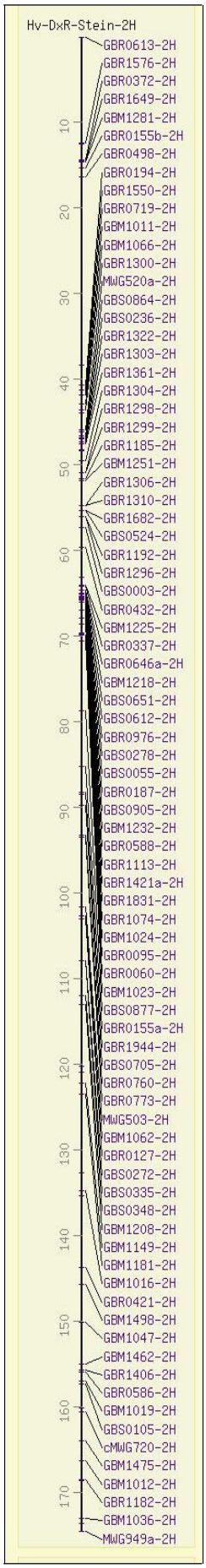
Azonosító	*GBM1359*	*GBM1498*	*GBM1404*
		allél (bp)	
UR021	145	152	263
UR098	145	152	-
UR026	145	149	263
UR091	139	149	257
UR011	145	149	257
UR041	145	149	257
UR110	145	149	257
UR046	145	149	257
UR093	145	152	257
UR126	145	149	257
UR130	145	149, 152	257
UR131	145	149	257
UR134	145	149	263
UR138	139	149	257
UR139	145	149	257
UR140	145	149	257
UR142	139	152	257
UR144	139	152	257
UR149	145	149	257
UR150	145	152	257
UR151	145	152	257
UR153	145	149	263
UR155	145	149, 152	257
UR157	145	149	257
UR158	145	149	257
UR162	139	152	257
UR164	145	149	257
UR166	139	149	257
UR175	145	152	257
UR029	145	149, 152	263
UR003	145	152	257
UR025	145	152	257
UR118	145	149	257
UR033	145	152	257
UR064	145	149	257
UR031	139	149	257
UR005	145	152	257
UR009	145	149	257
UR006	145	152	257
DOM	145	152	263
REC	139	149	257

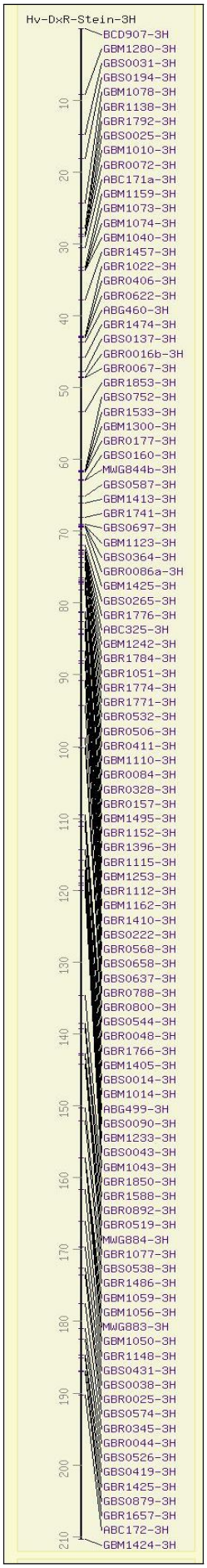
M5. A kontrollált vízellátású és a természetes csapadékellátottságú szántóföldi tesztrendszer területére vonatkozó talajnedvesség adatok

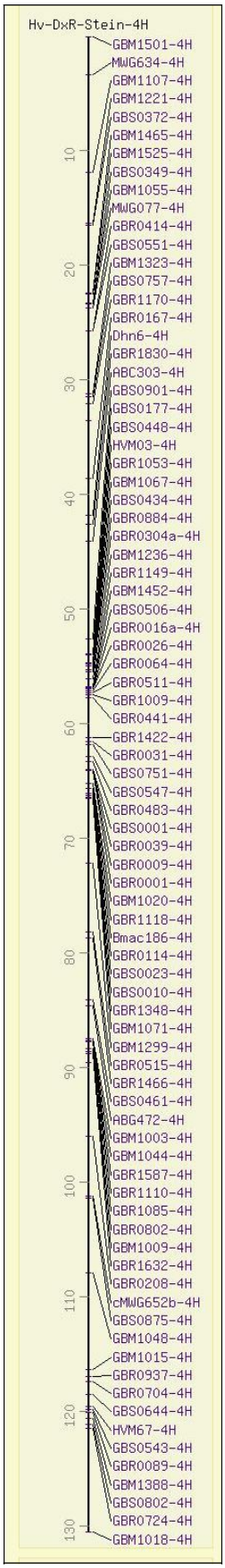


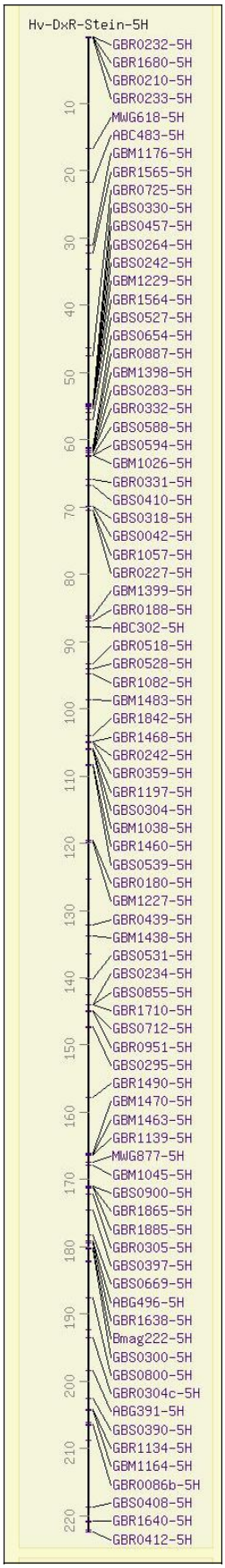
M6. Az OWB populáció kapcsoltsági térképe

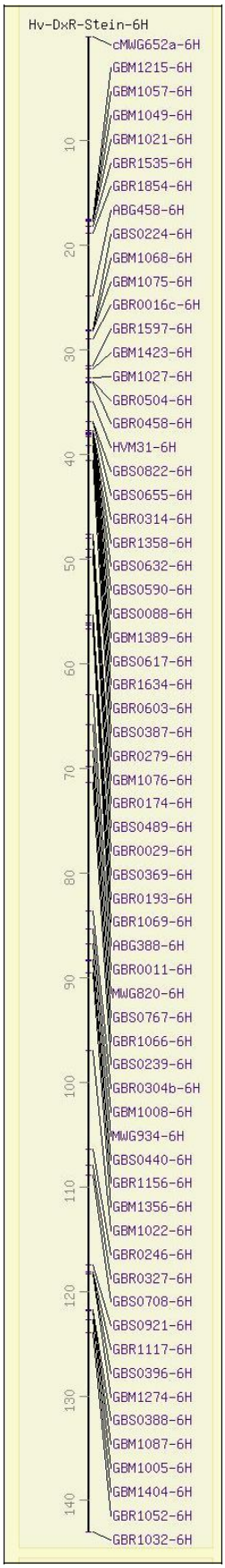


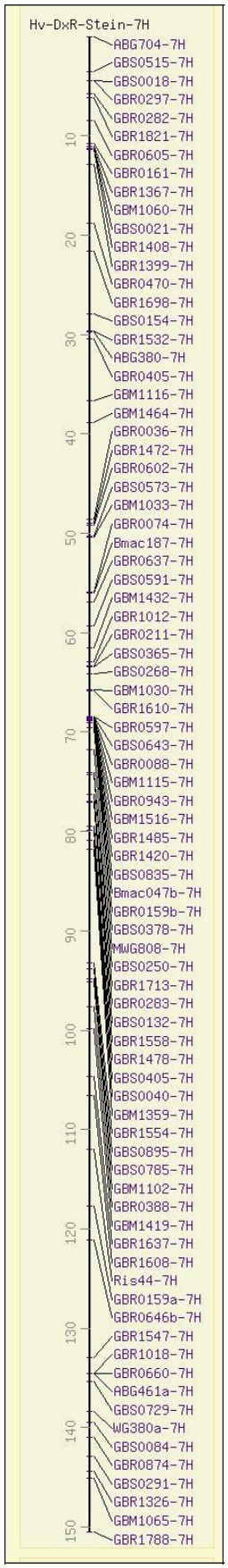





Hv-DxR-Stein-4H
GBM1501-4H
MWG634-4H
GBM1107-4H
GBM1221-4H
GBS0372-4H
GBM1465-4H
GBM1525-4H
GBS0349-4H
GBM1055-4H
MWG077-4H
GBR0414-4H
GBS0551-4H
GBM1323-4H
GBS0757-4H
GBR1170-4H
GBR0167-4H
Dhn6-4H
GBR1830-4H
ABC303-4H
GBS0901-4H
GBS0177-4H
GBS0448-4H
HVM03-4H
GBR1053-4H
GBM1067-4H
GBS0434-4H
GBR0884-4H
GBR0304a-4H
GBM1236-4H
GBR1149-4H
GBM1452-4H
GBS0506-4H
GBR0016a-4H
GBR0026-4H
GBR0064-4H
GBR0511-4H
GBR1009-4H
GBR0441-4H
GBR1422-4H
GBR0031-4H
GBS0751-4H
GBS0547-4H
GBR0483-4H
GBS0001-4H
GBR0039-4H
GBR0009-4H
GBR0001-4H
GBM1020-4H
GBR1118-4H
Bmac186-4H
GBR0114-4H
GBS0023-4H
GBS0010-4H
GBR1348-4H
GBM1071-4H
GBM1299-4H
GBR0515-4H
GBR1466-4H
GBS0461-4H
ABG472-4H
GBM1003-4H
GBM1044-4H
GBR1587-4H
GBR1110-4H
GBR1085-4H
GBR0802-4H
GBM1009-4H
GBR1632-4H
GBR0208-4H
cMWG652b-4H
GBS0875-4H
GBM1048-4H
GBM1015-4H
GBR0937-4H
GBR0704-4H
GBS0644-4H
HVM67-4H
GBS0543-4H
GBR0089-4H
GBM1388-4H
GBS0802-4H
GBR0724-4H
GBM1018-4H


Hv-DxR-Stein-5H
GBR0232-5H
GBR1680-5H
GBR0210-5H
GBR0233-5H
MWG618-5H
ABC483-5H
GBM1176-5H
GBR1565-5H
GBR0725-5H
GBS0330-5H
GBS0457-5H
GBS0264-5H
GBS0242-5H
GBM1229-5H
GBR1564-5H
GBS0527-5H
GBS0654-5H
GBR0887-5H
GBM1398-5H
GBS0283-5H
GBR0332-5H
GBS0588-5H
GBS0594-5H
GBM1026-5H
GBR0331-5H
GBS0410-5H
GBS0318-5H
GBS0042-5H
GBR1057-5H
GBR0227-5H
GBM1399-5H
GBR0188-5H
ABC302-5H
GBR0518-5H
GBR0528-5H
GBR1082-5H
GBM1483-5H
GBR1842-5H
GBR1468-5H
GBR0242-5H
GBR0359-5H
GBR1197-5H
GBS0304-5H
GBM1038-5H
GBR1460-5H
GBS0539-5H
GBR0180-5H
GBM1227-5H
GBR0439-5H
GBM1438-5H
GBS0531-5H
GBS0234-5H
GBS0855-5H
GBR1710-5H
GBS0712-5H
GBR0951-5H
GBS0295-5H
GBR1490-5H
GBM1470-5H
GBM1463-5H
GBR1139-5H
MWG877-5H
GBM1045-5H
GBS0900-5H
GBR1865-5H
GBR1885-5H
GBR0305-5H
GBS0397-5H
GBS0669-5H
ABG496-5H
GBR1638-5H
Bmag222-5H
GBS0300-5H
GBS0800-5H
GBR0304c-5H
ABG391-5H
GBS0390-5H
GBR1134-5H
GBM1164-5H
GBR0086b-5H
GBS0408-5H
GBR1640-5H
GBR0412-5H


Hv-DxR-Stein-6H
cMWG652a-6H
GBM1215-6H
GBM1057-6H
GBM1049-6H
GBM1021-6H
GBR1535-6H
GBR1854-6H
ABG458-6H
GBS0224-6H
GBM1068-6H
GBM1075-6H
GBR0016c-6H
GBR1597-6H
GBM1423-6H
GBM1027-6H
GBR0504-6H
GBR0458-6H
HVM31-6H
GBS0822-6H
GBS0655-6H
GBR0314-6H
GBR1358-6H
GBS0632-6H
GBS0590-6H
GBS0088-6H
GBM1389-6H
GBS0617-6H
GBR1634-6H
GBR0603-6H
GBS0387-6H
GBR0279-6H
GBM1076-6H
GBR0174-6H
GBS0489-6H
GBR0029-6H
GBS0369-6H
GBR0193-6H
GBR1069-6H
ABG388-6H
GBR0011-6H
MWG820-6H
GBS0767-6H
GBR1066-6H
GBS0239-6H
GBR0304b-6H
GBM1008-6H
MWG934-6H
GBS0440-6H
GBR1156-6H
GBM1356-6H
GBM1022-6H
GBR0246-6H
GBR0327-6H
GBS0708-6H
GBS0921-6H
GBR1117-6H
GBS0396-6H
GBM1274-6H
GBS0388-6H
GBM1087-6H
GBM1005-6H
GBM1404-6H
GBR1052-6H
GBR1032-6H


Hv-DxR-Stein-7H
ABG704-7H
GBS0515-7H
GBS0018-7H
GBR0297-7H
GBR0282-7H
GBR1821-7H
GBR0605-7H
GBR0161-7H
GBR1367-7H
GBM1060-7H
GBS0021-7H
GBR1408-7H
GBR1399-7H
GBR0470-7H
GBR1698-7H
GBS0154-7H
GBR1532-7H
ABG380-7H
GBR0405-7H
GBM1116-7H
GBM1464-7H
GBR0036-7H
GBR1472-7H
GBR0602-7H
GBS0573-7H
GBM1033-7H
GBR0074-7H
Bmac187-7H
GBR0637-7H
GBS0591-7H
GBM1432-7H
GBR1012-7H
GBR0211-7H
GBS0365-7H
GBS0268-7H
GBM1030-7H
GBR1610-7H
GBR0597-7H
GBS0643-7H
GBR0088-7H
GBM1115-7H
GBR0943-7H
GBM1516-7H
GBR1485-7H
GBR1420-7H
GBS0835-7H
Bmac047b-7H
GBR0159b-7H
GBS0378-7H
MWG808-7H
GBS0250-7H
GBR1713-7H
GBR0283-7H
GBS0132-7H
GBR1558-7H
GBR1478-7H
GBS0405-7H
GBS0040-7H
GBM1359-7H
GBR1554-7H
GBS0895-7H
GBS0785-7H
GBM1102-7H
GBR0388-7H
GBM1419-7H
GBR1637-7H
GBR1608-7H
Ris44-7H
GBR0159a-7H
GBR0646b-7H
GBR1547-7H
GBR1018-7H
GBR0660-7H
ABG461a-7H
GBS0729-7H
WG380a-7H
GBS0084-7H
GBR0874-7H
GBS0291-7H
GBR1326-7H
GBM1065-7H
GBR1788-7H

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Galiba Gábornak és Dr. Bálint Andrásnak szakmai irányításukért, segítségükért és tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Andreas Börner segítségét (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Németország), aki németországi tanulmányutaim során szakmai munkámat irányította, jelentősen hozzájárulva ezzel a dolgozat elkészüléséhez.

Köszönöm Kerstin Neumannak és Khalil Zaynali Nezhadnak (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Németország), hogy rendelkezésemre bocsátották a kémiai deszikkációs tesztek adatait.

Külön köszönettel tartozom az MTA MGKI Genetika és Növényélettani Osztály dolgozóinak, különösen Csabai Nórának a kísérletek kivitelezésében és a termés feldolgozásában nyújtott segítségükért valamint azért, hogy a laborban mindig mindent megtaláltam.

A dolgozatban leírt kísérletek és a doktori képzésem anyagi támogatásáért köszönettel tartozom az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetnek és a kapcsolódó pályázati forrásoknak.