

A poliploid gyümölcsfák termésbiztonságát befolyásoló néhány gén és génjelölt vizsgálata

Halász Júlia: Zárójelentés

A csonthéjas gyümölcsfák termésbiztonsága környezeti tényezőktől és genetikailag meghatározott mechanizmusoktól függ. Az elmúlt években a kutatások középpontjába három fő tulajdonság került, melyeknek döntő szerepe van a gazdaságilag kielégítő termésmennyiség kialakulásában: az *öntermékenyülési képesség* (I.), a *virágzási idő* (II.) és az *érésidő* (III). Míg a legtöbb információ az őszibarack, mandula és cseresznye fajokra korlátozódik, a magyar gyümölcsstermesztési ágazatban gazdasági szempontból a meggy és a szilva kiemelt jelentőségű. Ez utóbbi fajok poliploidok, vagyis kromoszómaszámuk többszörös. A pályázat keretében a gyümölcsfák biológiájának három különböző területét vizsgáltuk, amelyek alapját a legújabb nemzetközi és saját korábbi kutatásaink eredményei adták. A termékenyülési viszonyokat (*S-RN-áz* és *SFB* gének), a nyugalmi időszakot és a rügpattanás idejét (*CBF* és *DAM* gének) valamint az érési időt (*NAC* gén) meghatározó géneket és kandidáns géneket jellemeztük a két poliploid *Prunus* faj, illetve diploid rokon fajaik esetében. Olyan gyümölcsfajtákkal dolgoztunk, melyek a vizsgált szempontból eltérő fenotípusúak: önmeddők illetve öntermékenyülők; korai illetve kései virágzásúak; gyümölcseik korán illetve későn érnek. Eredményeink alapján olyan molekuláris markereket fejlesztettünk, amelyek nagyban segíthetik a nemesítést a gyümölcsfák magonc korban történő szelekciójával, hiszen ezen tulajdonságok mindegyike csak a termőre fordulást követően értékelhető, miközben a csonthéjas gyümölcsfákat hosszú vegetatív időszak (4–6 év) jellemzi. Ugyanakkor e gének elemzése a fajok kultúrevolúciós kapcsolatairól, illetve e gazdaságilag is fontos tulajdonságok molekuláris hátteréről új információval gazdagította a gyümölcsfákra vonatkozó biológiai ismereteinket.

I. Termékenyülési képesség

1. Szilvafajok

Magyarországon a szilvát széles körben szaporították hosszabb időn át ivaros úton, ezért jelentős, genetikailag változatos növényanyag állt rendelkezésünkre a vizsgálatokhoz. A munka során 17, gazdasági szempontból értékes (többek között PPV toleráns) európai szilvafajtát (*P. domestica* L.) valamint 38 tájfajtát, továbbá 17 kökény, kökényszilva fajtajelölteket (10 *P. spinosa* L., 4 *P. insititia* L. és 3 *P. spinosa* × *P. domestica*) vizsgáltunk SSR-markerekkel, valamint jellemeztük a termékenyülési fenotípusukat meghatározó S-lókuszt.

A szilvák termékenyülésére, a *Rosaceae* növény család más fajaihoz hasonlóan a gametofitikus inkompatibilitási rendszer a jellemző. Az *S-ribonukleáz* gén C2-C5 szakaszáról 113 db PCR-fragmentumot klónoztunk, majd az ismétléseket követően 339 db DNS-szekvencia állt a rendelkezésünkre az eredmények kiértékeléséhez. Összesen 24 különböző méretű fragmentumot detektáltunk, amelyből 11 allél részleges (C2-C5), valamint 3 allél (*S*₁₂, *S*₁₃, *S*₁₇) teljes (SP-C5) szekvenciáját elsőként írtunk le. A kimutatott S-allélok azonosságának megerősítése végett, a részleges és a teljes *S-RN-áz* allélokat BLASTN homológiavizsgálattal ellenőriztük a GenBank adatbázisában. Megállapítottuk az *S-RN-áz* allélok jellemző intronméreteit. Vizsgálataink során hat olyan transzspecifikus allélt azonosítottunk, melyek intronrégiójukban is kimagasló azonosságot mutattak (95,9–99,6%): *S*₁₁ - *Psal* *S*₂₆, *S*₁₂ - *Psal* *S*₂₃, *S*₁₄ - *Pspin* *S*₃₋₁, *S*₁₄ - *Pspin* *S*₃₋₂, *S*₁₄ - *Psal* *S*₂₅, *S*₂₃ - *Pspin* *S*₈, *S*₂₄ - *Pavi* *S*₃₀. Ezek viszonylag recens introgressziós események lenyomatának tekinthetők és alátámaszthatják az európai szilva komplex eredetét. A rendszer pollenkomponensét kódoló *SFB* gén analízise során közel

tíz új *SFB* allélszekvenciát izoláltunk, melyek több *Prunus SFB*, *Malus* és *Pyrus SFB* szekvencia használatával elvégzett filogenetikai vizsgálata megerősítette a *Prunoideae* és a *Maloideae* alcsaládok *S*-haplotípus *F*-box fehérjéinek különbözőségét az *S*-lókusz támogatta *SI* rendszerben.

Sikeresen azonosítottunk egy feltehetően funkcióképtelen *S-RN-áz* és *F-box* allélt (*S*_{16m} és *SFB_J*). Mindkét esetben a gén fehérjekódoló régiójában bekövetkezett nukleotidszubsztitúcióval járó mutációt detektáltunk, mely nonszensz mutációhoz, vagyis az allél funkcióvesztéséhez vezetett. Összesen 55 különböző eredetű szilvafajta (20 modern, 12 hagyományos, 20 tájfajta és 3 alanyfajta) teljes vagy részleges *S*-gentoípusát azonosítottuk, így a vizsgálatba vont egyedek elkülönítése az egyedi *S*-genotípusuk alapján sikeresnek bizonyult.

Az európai szilva *S*-haplotípusok teljes génszekvenciájának hiánya miatt, továbbra sem áll olyan adat a rendelkezésünkre, amely az öntermékenyülés kialakulásának genetikai hátteréről pontos információt nyújtana. Feltételezésünk szerint három funkcióját veszített haplotípus együttes jelenléte okozhat öntermékenyülő fenotípust, ennek igazolása további vizsgálatokat igényel.

Korábbi munkánk során megállapítottuk, hogy a *Falling Stones* transzpozon *S*-lókuszba történő beékelődésének köszönhetően alakult ki az öntermékenyülő jelleg kajsziban. Tekintettel arra, hogy az őszibarack genomában számos kópiája létezik a *FaSt* transzpozonnak, felmerült a kérdés, hogy hányféle változata azonosítható olyan csonthéjas gyümölcsökben, amelyek genomszekvenciája nem ismert. Ennek felméréséhez a diploid kajszi ('Goldrich') és a hexaploid európai szilva ('Haganta') fajokat választottuk, és a *FaSt* transzpozonra specifikus PCR primerekkel amplifikált fragmentumokat klónoztuk és meghatároztuk DNS-szekvenciájukat. A DNS-szekvenciák illesztése igazolta, hogy a feltételezhető *FaSt* kópiák között jelentős mértékű variabilitás mutatkozik. Az újonnan azonosított *FaSt* kópiák 45-90% mértékű egyezést mutattak a kajszi feltehetően aktív *FaSt* szekvenciájával. A szekvenciaeltérés mértéke ennek megfelelően utalhat az egyes kópiák kialakulása óta eltelt idő hosszára. A transzpozon két oldalán elhelyezkedő ún. TIR régiókat a transzpozáz enzimek felismerhetik, és a *FaSt* szekvenciákat áthelyezhetik. Ezért fontos volt megvizsgálni a szekvenciák 5' és 3' terminális részein található TIR régiókat (karokat). A minták nem mutattak nagyobb mértékű egyezést a kajsziban azonosított, aktív *FaSt* kópia TIR régióival, amelyből arra következtethetünk, hogy a transzpozáz valószínűleg nem ismeri fel a megváltozott TIR régiókat, ennek következtében nem képes kivágni a transzpozont, amely így stabilan rögzül az adott genomi pozícióban. A BLAST analízis során a vizsgált transzpozonok nukleotidsorrendjét hasonlítottuk össze az adatbázisban szereplő *Prunus* genomi szekvenciákkal. Az európai szilva hexaploid genomja újabb keletű, mint a diploid kajszi genom. A poliploidizáció következtében általában megnő a kromoszómaátrendeződések, ezen belül a transzpozíciós események gyakorisága. Ennek alapján elképzelhető, hogy a szilvában azonosított, és feltehetően ma már nem aktív *FaSt* kópiák nagy része később veszítette el áthelyeződési képességét (valamikor a hexaploid genom kialakulását követően), mint a kajszi hasonló inaktív *FaSt* elemei. Kutatásunk rámutatott, hogy a kajszi és a szilva genomában is jelentős változékonyságot mutat a *FaSt* transzpozon. *In silico* kereséseink kimutatták, hogy a *FaSt* jelen van számos *Prunus* szekvenciában, jellemzően az *S-RN-áz*t és néhány transzkripciósfaktort kódoló gén promóter- illetve intronrégióiban.

Az SSR-analízisek alapján elvégzett filogenetikai vizsgálat és a főkomponens (PCA) analízis kimutatta, hogy, a szilva tájfajtákat, a gazdaságilag jelentősebb szilvafajtákat és a kökény genotípusokat jelentős mértékű genetikai variabilitás jellemzi. A magyar tájfajták kiváló nemesítési alapanyagot képeznek, mert a modern fajtákra jellemző, nagymértékben leszűkült genetikai változékonyság növelhető a felhasználásukkal. Több folyamatban lévő vizsgálat igazolta értékes vírusellenálló tulajdonságukat, így bevonásuk indokolt a jövőbeli keresztezéses nemesítési programokba. Igazoltuk továbbá, hogy a vizsgált egyedek mindegyike

megkülönböztethető mindössze 7 SSR-markerrel, ami a megnövekedett ploidszintből következő nagyobb allélszámmal magyarázható. Ez a tény is kiemelt jelentőségű, hiszen a fajtaazonosság kérdése a gazdaságilag jelentős növények körében fontos tényező, a faiskolai fajtakeveredések, a fajtabejelentések során a DNS-alapú vizsgálatok nagyban megkönnyítik a kérdéses esetek tisztázását. A magyar tájfajták DNS-alapú azonosításának kidolgozásához szükséges egyedi SSR-ujjlenyomatokat meghatároztuk.

A poliploid kökény és rokon fajok esetében összesen 23 új S-allélt azonosítottunk, DNS-szekvenciájukat meghatároztuk. A fajtabejelentésre került kökény fajtajelöltek között inkompatibilitást nem találtunk, az önmeddő fajták ivari összeférhetőségének (egymás közti kölcsönös termékenyülésének) nincs genetikai akadály.

Az európai szilvafajták S-genotípusainak azonosítása az *S-RN-áz* allélok variabilitása alapján, valamint a *P. domestica* tájfajták és a gazdaságilag jelentősebb fajták genetikai variabilitásának és megkülönböztethetőségének jellemzése mikroszatellit markerek segítségével mind gyakorlati, mind kultúrevolúciós szempontból értékes eredményeknek tekinthetők és fontos alapját képezik további vizsgálatoknak.

2. Meggy

Összesen 24 termesztett fajtával és ígéretes fajtajelölttel kezdtük el a meggy molekuláris termékenyülési vizsgálatát. A tetraploid meggy S-allél-rendszeréről több adat is elérhető, így a korábban kidolgozott allélspecifikus CAPS-markerekkel számos S-haplotípust azonosítottunk (S_1 , S_6 , S_{13} és S_{36}). A variabilitás meghatározására SSR-vizsgálatokat végeztünk. Az egymáshoz genetikailag közel álló genotípusokon transzpozon alapú markerezési technikát (iPBS) teszteltünk, amivel sikerült különbséget kimutatnunk az 'Érdi bőtermő' meggyfajta klónjai között.

A meggy allopoliploid genomjának komplexitása nagyban megnehezíti az S-genotípus vizsgálatát, többféle markerezési technika együttes alkalmazására van szükség a diagnosztizáláshoz. A folyamatban kulcskérdés a vizsgálatok idő- és költségigénye. Megállapítottuk, hogy az eddig elérhető, egy amerikai-japán kutatócsoport által a meggy funkcióképtelen S-haplotípusainak kimutatására alkotott markerrendszer egyes elemei jól használhatók, de hatékonyságuk és megbízhatóságuk nem egyöntetű. Javaslatot tettünk a markerezési stratégia alábbi elemekkel történő kiegészítésére:

- 1) az *S-RN-áz* gén első intronrégióját jellemző méretek pontos meghatározása, illetve
- 2) az S_{36b2} -*RN-áz* allélnál az első intronrégióban azonosított dinukleotid mikroszatellit (CA) okozta méretpolimorfizmus, valamint az S_{6m} -nél szintén detektált 2 nukleotidos inszerció felhasználása.

Az általunk javasolt kiegészítő elemek az alábbi ütemezésben növelhetik a meggy által hordozott cseresznye- és cseplezme-gygy-eredetű S-allélok azonosításának megbízhatóságát:

- 1) azokban az esetekben, ahol nincs előzetes információ az S-genotípusról az *S-RN-áz* gén második és az általunk javasolt első intronrégió mérete alapján azonosítjuk az S-allélokat;
- 2) Ezt követően alkalmazzuk a funkcióképtelen változatok kimutatására tervezett markertechnikákat, kiegészítve az S_{36b2} -re és az S_{6m} -re általunk leírt új markerrel.
- 3) Az öntermékenyülés fenotípusos ellenőrzése bizonyos esetekben továbbra sem kerülhető meg, hiszen a korábban azonosított funkcióképtelen allélok mellett más, eddig nem azonosított, mutáns S-allélok is előfordulhatnak.

Vizsgálataink során az általunk tervezett új markerek eredményes felhasználásához szükséges paramétereket meghatároztuk.

A szelektált meggyklónok S-genotípusa teljesen megegyezett az eredeti fajtákéval. A 'Pándy' meggy gyakori felhasználása a nemesítés során tetten érhető az utódokban, hiszen S-

allél-készlete egyértelműen nyomon követhető utódainak genotípusában. Külön érdekességnek számít, hogy két fajtában ugyanazon S-allél (S_{36}) két funkcióját veszített változata is megtalálható volt. Kimutattuk, hogy a valamennyi meggyfajta között egyedi beltartalmi értékkel jellemezhető, magyar eredetű 'Pipacs 1' a többi vizsgált fajtától eltérő, egyedülálló S-genotípussal rendelkezik. Az S_{12} - és S_{14} -allélok semelyik másik általunk vizsgált meggyfajtában nem fordultak elő. A ritkán előforduló S_{26} -, valamint az S_{36b2} -allélok együttes megjelenése ugyanakkor csak a morello típusú Cigánymeggy klónfajtákban volt jellemző, így ezen allélok jelenléte arra enged következtetni, hogy az amarella típusú 'Pipacs 1' nagy eséllyel lehet a leszármazottja a Cigánymeggynek. Az önmeddő Pándy és az öntermékenyülő 'Újfehértói fürtös' genotípusa egyetlen allél mutációjában tér el, ami a pollenfunkciót tette tönkre. A mutáció bekövetkezhetett a 'Pándy' mikrosporogenezise során, melynek következtében a két mutáns allélt hordozó pollenszemek képessé váltak az öntermékenyítésre, de más, a Pándyhoz hasonló genotípusú egyeddel történő kereszteződés révén is kialakulhatott az 'Újfehértói fürtös'. Genetikailag az 'Újfehértói fürtös' sokkal közelebb áll a Pándy meggyhez, mint a Cigánymeggyekhez. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a genetikailag egymáshoz közel álló genotípusok között egyaránt előfordulhat amarella és morello típusú meggy, vagyis a gyümölcs festőlevűsége alapján nem szabad messzemenő következtetéseket levonni a fajták rokonsági kapcsolatára nézve.

3. Az önmeddő fenotípus megváltozásának hatása

Az önmeddő fenotípus öntermékenyülővé változásának hatását több csonthéjas faj esetében vizsgáltuk. Az egyik modellfaj a diploid mandula volt, ahol az öntermékenyülés viszonylag recens tulajdonság, néhány évtizeddel ezelőtt jelent csak meg. A mandulát Közép-Ázsiától az Egyesült Államokig nagy genetikai variabilitás jellemzi. A genetikai változékonyság nem mutat olyan mértékű, a domesztikációnak tulajdonítható, negatív irányú változást, mint más fajok (pl. a kajszi) esetében. Ebben szerepe van a vad fajokkal történő fajkereszteződés jelenségének is. Ilyen folyamatok vezetnek az eltérő földrajzi környezetben élő populációk differenciálódásához, elkülönüléséhez.

A másik jelentős ok, hogy a genetikai variabilitás leszűkülése minden csonthéjas faj esetében a heterozigótaság mértékének csökkenésével járt együtt, ami az öntermékenyülés kialakulása után következett be. Mandula esetében az öntermékenyülés viszonylag új jelenség, mégis kimutatható volt már az öntermékenyülő fajták heterozigótaságának kismértékű csökkenése. Eredményeink azonban igazolják, hogy ennek hátterében nem maga az öntermékenyülési képesség áll, hanem az a gyakorlat, hogy az öntermékenyülő mandulafajták kialakítását a nemesítési programokban felhasznált donor genotípusok köre rendkívül korlátozott (a legtöbb esetben a 'Tuono' fajta keresztezésével állították elő az öntermékenyülő fajtákat).

II. *A mélynyugalom, rügyfakadás és virágzási idő*

A fás növények mélynyugalmi állapotát szabályozó transzkripciós faktorokat kódoló gének vizsgálatát kajszi ('Zard' és 'Korai zamatos'), mandula ('Tuono' és 'Tétényi keményhéjú'), meggy ('Érdi jubileum' és 'Piramis') és szilva ('Stanley' és 'President') fajokból 2-2 fajta bevonásával kezdtük meg. A CBF (*C-repeat binding factor*) gének konzervatív régióira tervezett primerekkel mindegyik fajból izoláltunk CBF homológokat. A génexpresszió vizsgálatához a kajszit választottuk, mivel a csonthéjas gyümölcsfajok közül a fagykárak tekintetében Magyarországon a kajszi a leginkább veszélyeztetett faj. A korai virágzású 'Auróra' és 'Goldrich', illetve a kései virágzású 'Zard' és 'Stella' fajták vegetatív és generatív rügyeit gyűjtöttük be a hőmérsékleti adatok és a rügyek állapotának pontos rögzítésével. Azok a fajták, melyekre hosszabb mélynyugalmi időszak, és ezáltal lassabb rügyfejlődés jellemző,

ellenállóbbak a faggyal és a fluktuáló hőmérséklettel szemben. A virágrügy rügydifferenciálódás legjobban a pollenfejlődés (mikrosporogenezis) folyamatát vizsgálva követhető nyomon. Az egyes fejlődési fázisok egymásba való fokozatos átmenete néhány nap alatt következik be. A tetrád-állapot jelöli a mélynyugalmi időszak végét, fagytolerancia javításnál tehát azok a fajták lehetnek ígéretesek, melyeknek archesprórium- és füzér állapota hosszabb ideig tart. A pollenfejlődés mikroszkópos elemzését elkészítettük minden egyes mintagyűjtést követően, 2-3 napon belül. A begyűjtött mintákon a 3 célgén esetében (*CBF*, *DAM5* és *DAM6*) strukturális, filogenetikai és génexpressziós vizsgálatokat végeztünk.

Három, a mélynyugalom szabályozásában feltehetően résztvevő gént vizsgáltunk: *ParCBF1*, *ParDAM5* (*dormancy-associated MADS-BOX*) és *ParDAM6*. A filogenetikai elemzés alapján a *ParCBF1* a *Prunus mume* és *P. dulcis* *CBF1* génekkel homológ. A gén expressziós analízise két korai és két kései virágzású fajtában szignifikáns összefüggést mutatott az őszi és téli alacsony hőmérsékleti értékekkel. A *ParDAM5* és *ParDAM6* gének expressziója részben a *CBF1* gén expressziójának függvényében valamint a fajták hidegigényét (*chilling requirement*) jellemző értékeknek megfelelően változott, a mélynyugalom kialakulása során növekedett. A mélynyugalmi időszak vége felé a nagyobb hidegigényű, kései virágzású fajták *ParDAM5* és *ParDAM6* expressziója meghaladta a korán nyíló fajtákra jellemző értékeket, ami megerősíti, hogy a két újonnan azonosított kajszigénnek jelentős szerepe van a rügyek mélynyugalmi állapotának kialakulásában és megszűnésében.

III. Az érésidő

Az őszibarack érési idejét befolyásoló, NAC transzkripció faktor kódoló gén egyik allélja egy 9 nukleotidos inszerciót tartalmaz. Ez az allél egy olasz kutatócsoport eredményei alapján két hasadó nemzedék vizsgálata során együtt öröklődött a korai éréssel. Ezt az összefüggést egy jóval szélesebb növényanyag értékelésével támasztottuk alá. A korai 'Springtime' és a kései 'Vérbarack' őszibarackfajták NAC-szekvenciája között is megtaláltuk a 9 nukleotidos különbséget, majd fluoreszcens forward primer használatával fragmentumhossz-analízist végeztünk 110 fajta esetében. Az adatok alapján a korai fajták túlnyomó többsége homozigóta formában hordozza az inszerciót, a specifikus primerekkel 202 bp hosszú fragmentum detektálható. A kései fajták is homozigóták, ezeknél egyetlen, 193 bp hosszú fragmentum amplifikálódik. A középérésű fajták viszont heterozigóták. Statisztikai analízissel igazoltuk, hogy az általunk használt marker megbízhatóan használható az érési időre történő szelektálás elősegítésére (MAS) az őszibarack-nemesítési programokban. Ugyanakkor néhány esetben nem tapasztaltuk ezt a korrelációt. Az érési idő fontos gazdasági értékmérő tulajdonság, melyet több, jelenleg még nem azonosított gén befolyásol. A vizsgált NAC gén a rendszer egyik meghatározó, de nem egyetlen elemének tekinthető. Meghatároztattuk a kajszi, mandula és szilva fajok esetében is a génszekvenciát, de nem találtuk meg sem ezt a 9 nukleotidos indel mutációt, sem más különbséget, amely az érési idővel kapcsolatba hozható lenne.

A pályázat eredményeiből 6 impakt faktoros folyóiratban közzétett publikáció jelent meg, melynek kumulatív impakt faktora: 14,578 (az előre tervezett kb. 10 IF volt), 3 db D1, 3 db Q2 minősítésű lapban jelent meg. Továbbá 4 magyar és 1 angol nyelvű lektorált folyóiratcikk készült. Emellett 3 nemzetközi és 4 magyar konferencián mutattuk be eredményeinket előadás, poszter és videóposzter formájában. Az eredményekből 2 PhD dolgozat, 4 diplomamunka, illetve egy OTDK 1. helyezett dolgozat is készült.