

A VADKÖRTÉK GÉNMEGŐRZÉSE FAJAZONOSSÁG ÉS DIVERZITÁS MEGHATÁROZÁS IZOENZIM ÉS DNS VIZSGÁLATOK SEGÍTSÉGÉVEL

Szulcsán Gábor¹, Cseke Klára², Dr. Borovics Attila³

¹ KEFAG Rt. ESZTK 6000 Kecskemét József Attila u. 2,

² Erdészeti Tudományos Intézet Sárvári kutatóállomás Sárvár

³ Erdészeti Tudományos Intézet Sárvári kutatóállomás Sárvár

A GÉNMEGŐRZÉS TÖRVÉNYI ALAPJAI

- A Biológiai sokféleség egyezmény kihirdetéséről szóló 1995. évi LXXXI. törvény rendelkezik a genetikai anyagok megőrzésének feladatairól.
- A természet védelméről szóló 1996. évi LIII. törvény 1. § a) rendelkezik biológiai sokféleség védelmének fontosságáról.
- Az erdőről és az erdő védelméről szóló 1996. évi LIV. törvény 2.§ (1) rendelkezése szerint „az erdőt olyan módon és ütemben lehet használni, hogy az erdő megőrizze biológiai sokféleségét, természet közelségét, termőképességét, felújuló képességét, életképességét.”
- A növényi genetikai anyagok megőrzéséről és felhasználásáról szóló 95/2003. (VIII.14.)FVM rendelet
4. § (1) A haszonnövények körében a következő génforrásokat kell ex situ gyűjteményekben megőrizni:
 - a) a magyar származású fajtákat, a magyar tájfajták helyi változatait és az ökotípusokat,
 - b) a belföldi flóra mezőgazdasági, kertészeti és erdészeti szempontból jelentős fajainak (haszonnövény rokonfajok, takarmányértékű fajok, gyógy-, fűszer- és dísnövényfajok, gyümölcs és szőlő, valamint erdészeti hasznosítású fajok) veszélyeztetett állományait,
 - c) a Magyarországon természetű haszonnövények vad rokonfajait, amelyekből a génátvitel hagyományos és géntechnológiai módszerekkel lehetséges,
 - d) a magyar növénytermesztés, növénynevelés, oktatás, illetve a magyar haszonnövény-alap kutatás és alkalmazott kutatás számára értékes tulajdonságokat hordozó fajtákat, törzseket, vonalakat és klónokat,

- e) a termesztésbe vonás, a növénynemesítés, az oktatás, a kutatás és a választékbővítés céljából jelentős, a nemzetközi génbank-együttműködési rendszer keretében be nem szerezhető külföldi eredetű génforrásokat,
- f) az erdészeti fajokat, amelyekből állami elismerésben részesített vagy állami elismerésre bejelentett fajta van.

(2) A genetikai anyagokat in situ, on farm, ex situ és in vitro módszerekkel lehet fenntartani.

A GÉNMEGŐRZÉS CÉLJAI

A génmegőrzés célja a genetikai erőforrások védelme. Egy adott faj genetikai erőforrásai alatt mindazokat a növényanyagokat, azaz természetes előfordulásokat, mesterségesen létrehozott ültetvényeket és gyűjteményeket értjük, amelyek aktuálisan vagy potenciálisan hasznos genetikai információt hordoznak, ezért védelmük ökonómiai vagy ökológiai okokból, vagy egyszerűen a faj genetikai diverzitásának fenntartása miatt szükségesnek látszik.

ELŐZMÉNYEK

- 1995: a Földművelésügyi Minisztérium létrehozta a Növényi Génbank Tanácsot (NGT).
- 1996: megalakult az NGT Erdészeti Munkabizottsága
- 1997: Az Erdészeti Szaporítóanyag Termesztési Központ bekapcsolódik a génmegőrzési munkába
- 1997-2005 a csalánosi géngyűjteményben létrehoztunk egy 145 (41+104) *Pyrus sp.* genotípusból álló géngyűjteményt. (*Pyrus pyraeaster*, *Pyrus magyarica*, *Pyrus nivalis*, *Pyrus x sp.*)

A GÉNMEGŐRZÉSI MUNKA FOLYAMATA - ANYAG ÉS MÓDSZER

- a génmegőrzési körzetek kialakítása
- a körzetekben törzsfák felkutatása
- a törzsfák leírása, begyűjtése, felszaporítása
- ex situ géngyűjteménybe helyezés
- a gyűjteményben lévő anyag vizsgálata
- morfológiai (morfológiai, virágzás biológiai)
- Genetikai (izoenzim, DNS) vizsgálatokkal
- magtermesztés, repatriálás

GENETIKAI VIZSGÁLATOK - ANYAG ÉS MÓDSZER

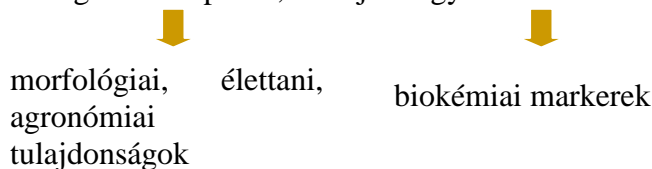
Vizsgálati anyag: KEFAG Rt. csalánosi ex-situ géngyűjtemény mintegy 130 db *Pyrus* genotípusa. A vizsgálat kivitelezését a KEFAG Rt. megbízásából Erdészeti Tudományos Intézet Sárvári Kísérleti Állomás - Genetikai Laboratóriumában Dr. Borovics Attila és Cseke Klára végezte.

Két genetikai vizsgálati módszer került alkalmazásra:

1. Izoenzim vizsgálatok
2. DNS vizsgálatok

A genetikai markerek fogalma és jellemzői

A **genetikai markerek** tulajdonságokat meghatározó allélek, amelyeknek sajátosságait fenotípusos, fehérje- vagy DNS-szinten vizsgáljuk.



A **molekuláris marker**: nukleinsav fragmentum, géntermék, amplifikációs termék vagy primer, hibridizációs próba, amely molekuláris tesztekkel kimutatható és kapcsolható valamely fenotípusos jelleghez.

Az izoenzim-markerek:

- Az izoenzimek fogalma:
Egy faj olyan enzimformáit, amelyek azonos (hasonló) katalitikus hatásúak, de eltérő fizikai-kémiai szerkezetűek izoenzimeknek nevezzük (Markert és Moller, 1959) különböző genetikai eredet - azonos funkció
- Eredetük:
 - több lókuszon kódoltak (eltérő struktúrgének, génduplikációval) *izoenzim*
 - azonos lókusz több allélja (mutáció) *allozim*
 - posztranszlációs modifikáció, szomatikus mutáció (nem örökletes)

Az ideális markerek jellemzői:

- nagyfokú polimorfizmus
- kodomináns öröklődés

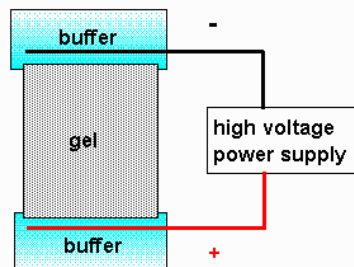
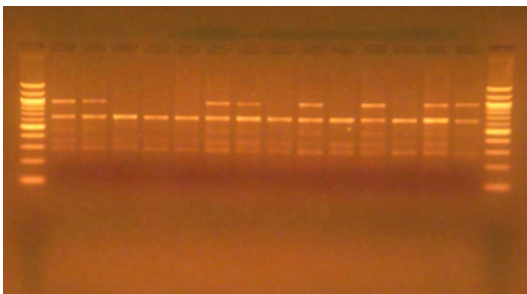
- az allélek egyértelmű jelölése
- gyakori előfordulás a genomban
- egyenletes megoszlás a genomban
- reprodukálhatóság
- könnyű hozzáférhetőség
- olcsó kifejlészthetőség

A biokémiai markerek csoportjai:

- alacsony molekulatömegű markerek - fenolszármazékok, alkaloidok, nem fehérjealkotó aminosavak (kromatográfiás technikák)
- izoenzimek, tartalékfehérjék
- DNS-markerek

A gél-elektroforézis elve:

- homogén közegben, az egyenáramú erőter hatására, a töltéssel rendelkező molekulák a pólusok felé vándorolnak
- az elmozdulás sebessége függ:
 - a közegellenállástól
 - a molekulák fajlagos töltésétől (kisebb tömeg, nagyobb töltés gyorsabban mozog)
- közeg: szűrőpapír, membrán, film, gélek (agaróz, keményítő, poliakril-amid), kapilláris



Az izoenzim vizsgálatok előnyei:

- kodomináns allélexpresszió,
- nincs episztatikus kölcsönhatás,
- környezeti tényezők hatásától jórészt függetlenek,
- különböző lókuszek alléljai jól megkülönböztethetők,

- az allélikus különbségek elektroforetikus mobilitásbeli különbségekként detektálhatók,
- egyszerűen, gyorsan és olcsón vizsgálhatók.

Az izoenzim vizsgálatok alkalmazásának lehetőségei:

- populációk molekuláris polimorfizmusának meghatározása,
- taxonómiai besorolás,
- differenciális génexpresszió tanulmányozása,
- nemesítési alapanyagok genetikai jellemzése,
- heterózishatás előrejelzése,
- haploidok előzetes detektálása,
- bejuttatott idegen gének kimutatása.

DNS-módszerek esetében a polimeráz láncreakció alapuló RAPD eljárást alkalmaztuk (Polymerase Chain Reaction, PCR). Lényege: DNS célszekvenciák in vitro felszaporítása enzimatikus úton (Mullis, 1985).

Összetevői :

templát DNS

hőstabil DNS-polimeráz (Taq)

dNTP mix

lánckezdő oligonukleotidok (primerek)

Thermocycler

Lépései:

egy ciklusban:

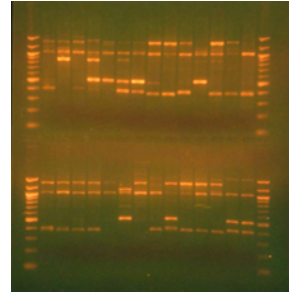
1. Denaturáció
2. Primer kapcsolódása
3. Komplementer szál szintézise 30-40 ciklus
→ Szintetizált DNS mennyisége exponenciálisan nő

A RAPD eljárás leírása:

Véletlenszerűen választott 1 vagy 2, ~10 bázis hosszú primer (nem komplementerek!) maximum ~2 kb hosszú amplifikált szakaszok a polimorfizmus forrása: bázisszám-változás a primerek kötőhelyei között (inszerció, delécio) mutációk a primerekkel komplementer szekvenciákban (kötőhelyek kialakulása vagy eltűnése) kivitelezése: agaróz gél-elektroforézis, ethidium-bromidos festés, UV fény.

Alkalmazási területei:

- genetikai különbségek detektálása,
- homogenitás-vizsgálatok,
- tulajdonságok térképezése,
- DNS-fingerprinting.



Előnyei:

kevés minta-DNS-t igényel,
egyszerű, gyors, könnyen optimalizálható,
könnyen automatizálható reakció és kiértékelés,
kis mintaszám esetén a többi DNS-módszernél olcsóbb.

HIPOTÉZIS

➤ A vizsgáltba vont genotípusokat fenotípusos bélyegek alapján négy csoportba soroltuk (csoportokat alakítottunk ki), ezek után vizsgáltuk a fenotípusos bélyegek alapján egy csoportba sorolt egyedekből alkotott csoportok egymáshoz viszonyított helyzetét, a hasonlóságokat, különbségeket. A felállított csoportok:

- (pop.1) - *Pyrus pyraeaster*
- (pop.2) *Pyrus magyarica*
- (pop.3) *Pyrus nivalis*
- (pop.4) *Pyrus x. pannonica* (*Pyrus pyraeaster* x *Pyrus nivalis*; Terpó után)

A vizsgálatokat két módszerrel végeztük el:

➤ Izoenzim vizsgálattal

- 115 genotípus
- 4 csoport (pop1-4)
- 4 enzim

➤ RAPD vizsgálattal

- 124 genotípus
- 4 csoport (pop1-4)
- 4 primer

Izoenzim vizsgálatok eredményei

115 genotípus

4 csoport (pop1-4)

4 enzimrendszer

Ahol:

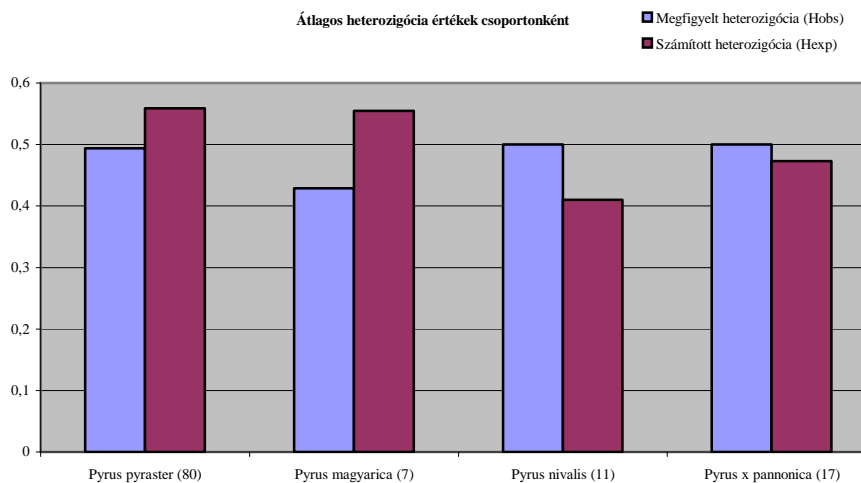
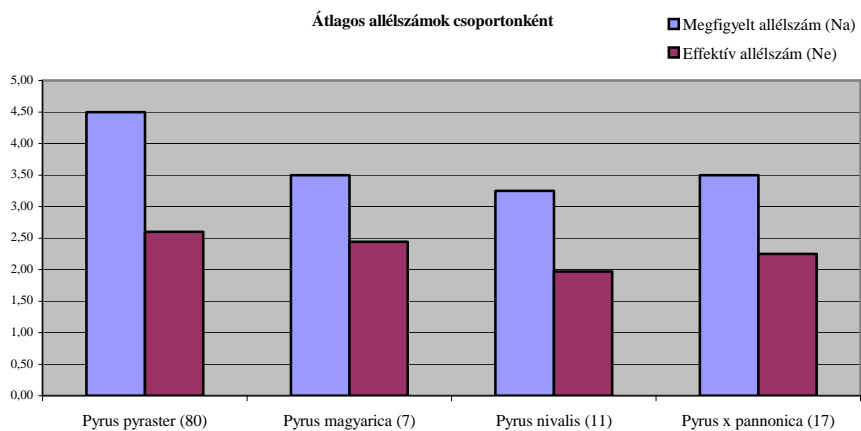
Pop1-Pyrus pyraester

Pop2-Pyrus magyarica

Pop3-Pyrus nivalis

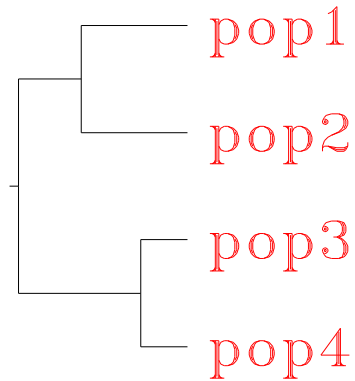
Pop4-Pyrus x. pannonica

Csoporton belüli genetikai jellemzők

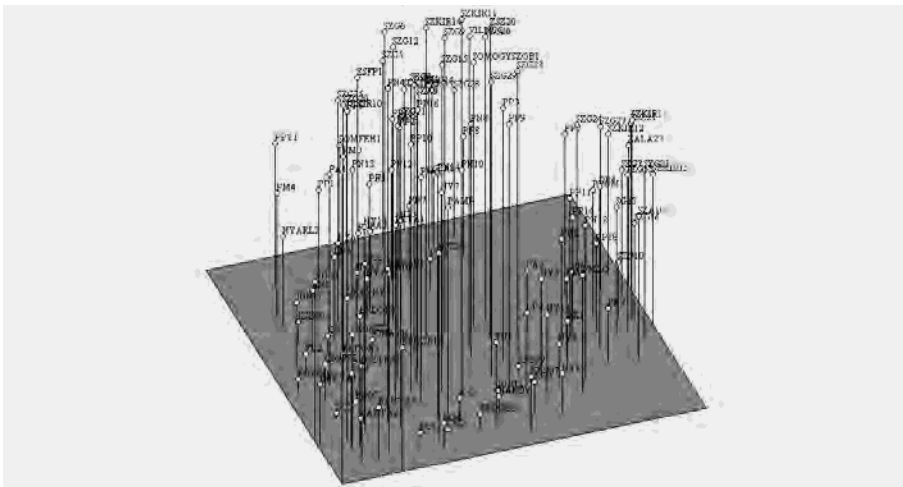


Csoportok közötti genetikai különbözőség

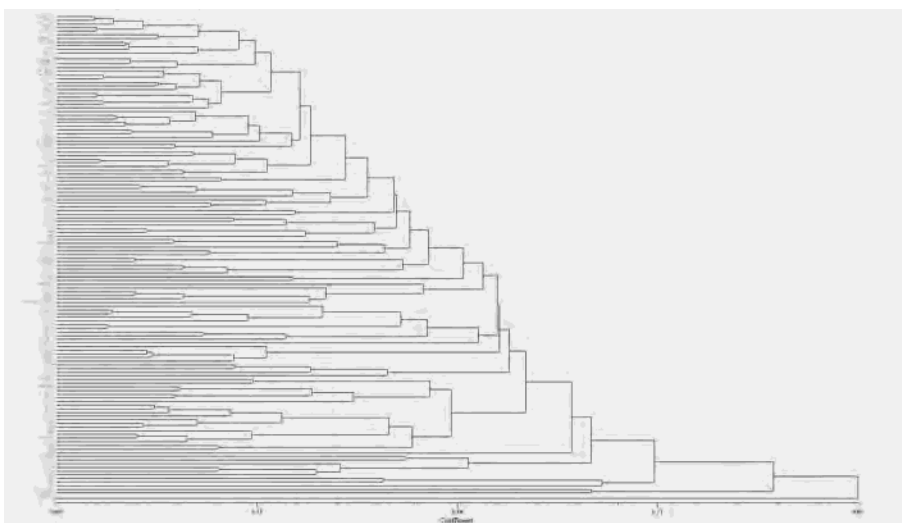
Genetikai távolságon alapuló dendrogram - A négy csoport közötti genetikai különbözőség



Sokdimenziós skálázással készített ordináció - Egyed szintű genetikai változatosság



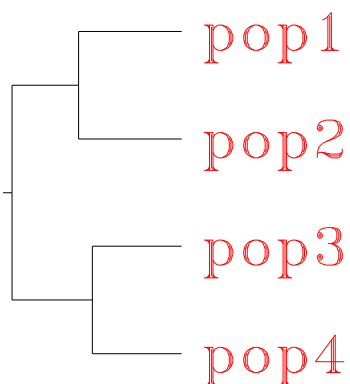
Genetikai távolságon alapuló dendrogram - Egyed szintű genetikai változatosság



A DNS vizsgálat eredményei

124 genotípus
4 csoport (pop1-4)
4 primer

A DNS vizsgálatok esetében a legfontosabb eredmény a RAPD markerek alapján előállított genetikai távolságon alapuló dendrogram, amely szemléletesen ábrázolja a négy csoport közötti genetikai alapú hierarchikus kapcsolatot.



Következtetések:

Az izoenzim és RAPD vizsgálatok nagyon hasonló eredményt mutatnak, a csoportok léte és elkülönülésük mértéke tekintetében.

1. Két elkülönülő csoportot jelenlétét igazolják a vizsgálatok: (1,2 pop) *Pyrus pyraester*, *Pyrus magyarica* (3,4 pop) *Pyrus nivalis*, *Pyrus x pannonica*
2. Az ex situ gyűjteményben a legváltozatosabb allélszerkezetű csoport a *Pyrus pyraester*
3. A legkevésbé változatos csoport a *Pyrus nivalis*
4. Magas heterozigóciával jellemezhető a *Pyrus nivalis* és a *Pyrus x. pannonica* csoport
5. Az ex situ gyűjteményben termelt magok genetikai leltározása választ adhat az ex situ génmegőrzés hatékonyságára.