

**OTKA azonosító: 82037**

**Pályázat címe: Kloroplaszt mutánsok alkalmazása GM növények környezeti kockázatbecslésében**

## **Projekt záró szakmai beszámoló**

### **1. Általános bevezetés**

A legújabb tanszplasztomikus technológiával előállított GM növényekkel folyó intenzív kutatások arra engednek következtetni, hogy a dohányon kívül hamarosan más, gazdaságilag jelentős növényeknél is megjelenik a technológia alkalmazása. A módszer újdonsága miatt környezetbiztonsági adatok, amelyek közül a legjelentősebb a transzgén nem-kívánatos elterjedése, gazdaságilag fontos növények esetén még nem állnak rendelkezésre. Pályázatunk célja volt génsodródás kockázatbecslésére alkalmas rendszer kidolgozása kloroplaszt mutánsok segítségével egy gazdaságilag fontos pillangós növényben, a lucernában. A javasolt projekt újszerűsége abban rejlett, hogy a génsodródás vizsgálatához a GM növényeket a kloroplaszt mutáns növényekkel kívántuk helyettesíteni, így a környezeti kockázat már a vizsgálati fázisban kizárható.

A növények nagy részében a kloroplasztisz anyai úton öröklődik, a lucerna azonban azon ritka növényfajok egyike, amely kloroplasztiszát anyai és apai úton is képes átörökíteni utódaira. A kloroplasztiszban található mutációk jelző génként alkalmazhatók a kloroplasztiszok öröklődésének vizsgálatára. Környezeti kockázat felmérési kísérleteinkhez általunk izolált, plasztiszban lokalizált spektinomycin rezisztenciát hordozó növényeket alkalmaztunk. A mutációt markerként használtuk, amelynek segítségével különböző kereskedelmi lucernafajtákkal történő keresztezésekben vizsgáltuk a spektinomycin rezisztencia utódokban való megjelenését.

### **2. Részletes zárójelentés**

#### **2.1. Spectinomycin rezisztens mutánsok**

##### **2.1.1. Mutánsok izolálása és a mutáció azonosítása**

*Medicago sativa* RegenSY tetraploid lucernavonal leveléből szövettényészetben, szomatikus embriógenézisen keresztül, spektinomycin jelenlétében spontán antibiotikum rezisztens vonalakat (SpecR) izoláltunk. Szövettényésztéshez a kiindulási anyagaink növényházban nevelt, vegetatívan szaporított lucerna növények (*Medicago sativa* RegenSY) fiatal levelei voltak. A leveleket sterilizálás után a főerre merőlegesen 3-4mm-es csíkokra vágtuk. A levéldarabkákat Gamborg B5h (Duchefa) táptalajra helyeztük, amelyet kiegészítettünk aminosavakkal (adenin, szerin, glutamin és L-glutation), hormonokkal (kinetin és 2,4D) és spektinomycinnel. A levéldarabokat ezen a kallusz indukáló B5h táptalajon tartottuk két hetenkénti átrakással addig, amíg a spektinomycin mentes kontrollon embriók jelentek meg. Ezután MMSN táptalajra helyeztük az elkalluszosodott explantokat. Az elfehéredő fejlődő embriókat eltávolítottuk a kalluszokról, míg azokból az embriókból, melyek zöldek maradtak, teljes növényt regeneráltattunk hormonmentes spektinomycint tartalmazó MS táptalajon. A regeneráltatás során csak a vad típusra hasonlító növényeket tartottuk meg. A SpecR növények homoplasztómikussá tételét a regenerált növények szövettényészetben, spektinomycin jelenlétében történt háromszori, egymást követő újra regeneráltatásával értük el.

A génbanki szekvencia hiányában először a vad típusú trn-V – rps12 régió szekvenciáját határoztuk meg, amely magába foglalja a 16S rRNS gént is (Accession: JX 185400 ). A mutáns azonosításhoz a spektinomycin rezisztens növényekből DNS-t izoláltunk és a szekvencia ismeretében tervezett

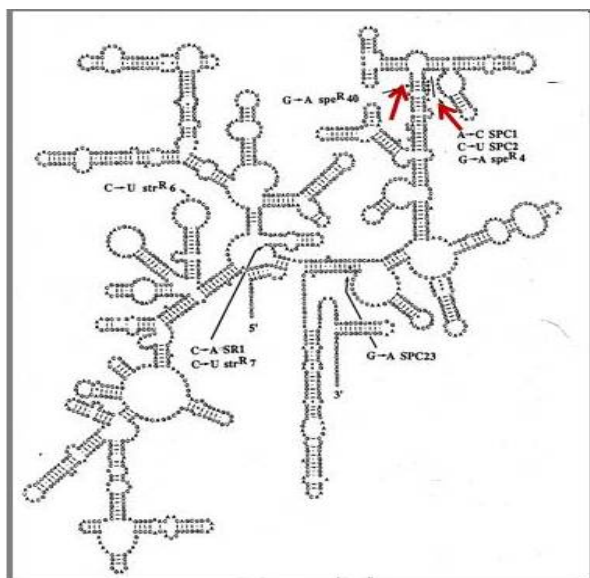
16S riboszómális RNS (rRNS) gén-specifikus primerpárokkal PCR fragmenteket készítettünk. A kapott fragmenteket megszekvenáltattuk és a szekvenciákat összehasonlítottuk a vad típusú lucerna szekvenciával, illetve egyéb génbanki szekvenciákkal, elsősorban a *Medicago truncatula* kloroplaszt DNS szekvenciával, amit a továbbiakban is referenciaként használtunk (Génbank azonosító NC\_003119).

Összesen 31 spektinomycin rezisztens lucernavonalat izoláltunk, amelyekben azonosítottuk a mutációt. A mutációk a RegenSY 16SRNS gén két régiójába (1014-1018 és 1138-1142) lokalizálódtak (1. táblázat), ezek megfelelnek a spektinomycin kötőhelynek, ami a gén konzervatív régiójában, a h34 hélixben található (1. ábra).

<i>Ms</i> RegenSY 16S rRNS régió	Vad típusú szekvencia	Összes mutáns	Báziscsere	Vonalak száma	Mutáns szekvenciák
1014-1018	CGTCA	26	G-C	20	CCTCA
			C-A	4	CGTAA
			C-T	2	CGTTA
1138-1142	TGACG	5	A-T	1	TGTCA
			C-G	3	TGAGG

1.táblázat

A spectinomycin kötőhely megváltozása miatt a növények rezisztenssé váltak az antibiotikumra, amely a vad típusú (azaz spektinomycin érzékeny) növények kifehéredését, majd pusztulását okozza, a fehérjeszintézis gátlása miatt, a mutáns növényekben a kötőhely változása miatt a spektinomycin nem képes kötődni a 16S RNS-hez, így a növényekben a kloroplaszt fehérjeszintézis változatlanul folyik az antibiotikum jelenlétében is.



1. ábra: a mutáns régiókat piros nyíllal jelöltük

### 2.1.2. A mutáció öröklődése és a homoplasztómikus mutánsok jellemzése

A háromszoros re-regeneráció után nyert homoplasztómikus vonalakat üvegházba ültettük és elvégeztük a fenotípus vizsgálatukat. A 31 azonosított SpecR mutációt hordozó vonalból 27 normális fenotípusú volt, semmilyen szempontból nem különbözött el a kiindulási RegenSY vonaltól. Összesen négy rendellenes vonalat találtunk, ebből három a normálistól eltérő fenotípusú levéllel rendelkezett (2. ábra), nagyon kevés és infertilis virág fejlődött rajtuk és fokozottan érzékenyek voltak néhány biotikus (kórokozók, elsősorban gombák) és abiotikus (talaj víztartalma) tényezővel

szemben. A harmadik vonal levélformája normális, de a vad típushoz képest kisebb, vékonyabb és halványabb színű leveleket hoz. A fokozott érzékenység a nedvességgel szemben erre a vonalra is jellemző, de ez normális, fertilis virágokat produkált. A további vizsgálatokból ezt a négy vonalat kizártuk.



**2.ábra:** vad típusú és a morfológiailag eltérő levél és teljes növény

Feltételeztük, hogy az eltérő fenotípus nem a 16S rRNS génben, hanem másutt (kromoszóma) bekövetkezett változás eredménye, ezért ezzel a négy vonallal a pályázat keretén belül a továbbiakban nem foglalkoztunk. A 27 vonal esetében sem méretbeli sem színbeli eltérést nem tapasztaltunk, de néhány random kiválasztott vonal esetében meghatároztuk a szárazanyag és a klorofill tartalmat. Az adatok alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a vad típusú növény és a mutáns vonalak között a mért paraméterekben.

Következő lépésként a SpecR mutáció átörökíthetőségét igazoltuk, oly módon, hogy a virágokat önbeporoztuk és a magokat spektinomycin jelenlétében csíráztattuk (3. ábra). A vizsgált vonalakban nem tapasztaltunk szegregációt, a 100%-ban történő átörökíthetősége alapján igazoltuk, hogy a spektinomycin rezisztenciát ezekben a vonalakban a 16S rRNS génben bekövetkezett mutáció okozza.

Ms RegenSY-T2 line	No. seed tested	Spectinomycin resistant
RegenSY-T2	9	0
MsRSY-SP24151	7	7
MsRSY-SP2911	11	11
MsRSY-SP3531	12	12
MsRSY-SP4251	11	11
MsRSY-SP5501	16	16
MsRSY-SP5502	10	10
MsRSY-SP5503	6	6
MsRSY-SP7141	3	3
MsRSY-SP7151	10	10
MsRSY-SP7171	10	10
MsRSY-SP8301	8	8
MsRSY-SP8401	3	3
MsRSY-SP9601	10	10
MsRSY-SP10401	9	9
MsRSY-SP15131	10	10
MsRSY-SP15232	12	12
MsRSY-SP18291	10	10



**3.ábra:** a spektinomycin rezisztencia átöröklésének igazolása

## 2.2. Keresztező partnerek

### 2.2.1. Fajták kiválasztása

A keresztező partnerek kiválasztásához 3 különböző nemesítési helyről (Kisvárdra, Kompolt és Szarvas) származó 20 kereskedelmi fajtát használtunk: Adél, Alexandra, Anna, Hunor, Irisz, Jozsó, Kákai legelő, Kisvárdra, Klaudia, KM-Agro, KM-Gyöngy, KM-Norbert, Kőrös, Lily, Maraton, Solar, Szarvasi, Szapkó, Verkó, Viktória. Minden fajtából 50-50 magot vetettünk, majd a növényekből DNS izoláltunk, amit a kloroplaszt polimorfizmus vizsgálatához használtunk.

## 2.2.2. Polimorfizmusok azonosítása

Feladatunk a megfelelő tetraploid keresztező partnerek kiválasztása volt, a RegenSY-hoz képest polimorfizmust mutató régiók alapján. Mivel a *Medicago sativa* kloroplaszt DNS teljes szekvenciája nem ismert, így a markerek fejlesztéséhez a *Medicago truncatula* kloroplaszt DNS szekvenciáját használtuk alapul. A 16S rRNS gén a *Mt* kloroplaszt DNS 25888-27378 pozíciói között található, ezért a többi marker keresésénél az volt a szempontunk, hogy a teljes kloroplaszt DNS-t tudjuk markerekkel jellemezni. Az NC\_003119 *Medicago truncatula* génbanki szekvencia alapján, már ismert polimorfizmusokat (AFLP vagy SNP) mutató régiókra primereket terveztünk, majd ezekkel PCR-t végeztünk a vad típusú *Medicago sativa* RegenSY vonalból és kereskedelmi fajták néhány kiválasztott egyedéből. A kapott szekvenciák alapján, a spektinomycin rezisztenciával együtt, 7 markert alakítottunk ki, a markerek részletes leírását a 2a. táblázat, míg a markerek kimutatásának módszerét a 2b. táblázat tartalmazza.

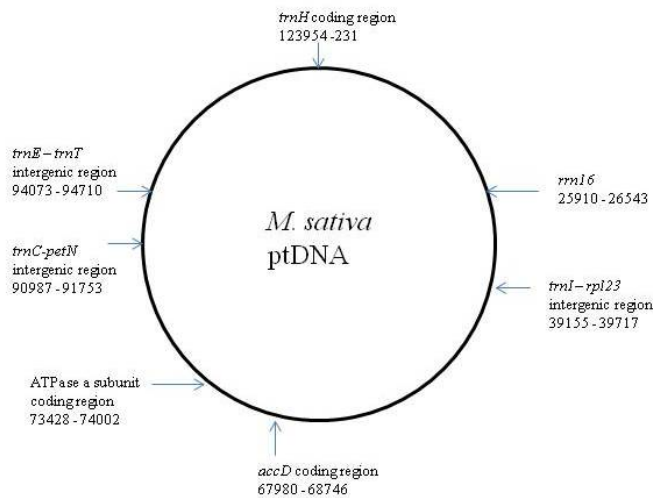
Marker	Lókuszt	Pozíció	Növény	Szekvencia (5' – 3')
M1	<i>trnH-ndhF</i>	203	RY	ttat - - - - - atttattatataaatata G aat
			KMN5/KMN20	ttat TTTCT atttattatataaatata G aat
M26	<i>rrn16</i>	26115	RY/KMN5/KMN20	tgctgtc G tcagctgtc
			RY11	tgctgtc C tcagctgtc
		26117	RY/KMN5/KMN20	tgctgtcgt C agctgtc
			RY15	tgctgtcgt A agctgtc
		26240	RY/KMN5/KMN20	tgaggatg A cgtaagtc
			RY16	tgaggatg T cgtaagtc
		26241	RY/KMN5/KMN20	tgaggatga C gtaagtc
			RY17	tgaggatga G gtaagtc
RY18	tgaggatga T gtaagtc			
M39	<i>trnI-rp123</i>	39155	RY	gtaattatttac - - - - - gtaaaact
			KMN5	gtaattatttac TTGACT gtaaaact
M55	„replication slippage” régió	55506	RY/KMN5	hossz polimorfizmus
M68	<i>accD</i> kódoló régió	67980	RY/KMN5	hossz polimorfizmus
M73	<i>ATPase</i> $\alpha$ alegység	73868	RY	gaactctggaataat C ccggagcggga
			KMN5	gaactctggaataat A ccggagcggga
M90	<i>trnC-petN</i> intergenic régió	90494	RY	cgaaa AATCA ttagaggat
			KMN5	cgaaa - - - - - ttagaggat
M94	<i>trnE-trnT</i> intergenic régió	94073	RY	ctggaacagg C gcggcattaac
			KMN5	ctggaacagg T gcggcattaac

2a.táblázat

Marker	Primer pár	Típus	Kimutatás	Enzim
M1	F: 5' GCGGATGTAGCCAAGTGGAT 3' R: 5' GTATTCATCTTTTAGTAATTTGTTATA 3'	SNP	CAPS	PsiI
M26	F: 5' TTCCAGTACGGCTACCTTGT 3' R: 5' GGAGTACGTTTCGCAAGAATG 3'	SNP	CAPS	DdeI /AatII -
M39	F: 5' GAACCCTACCTCCATAAAGTC 3' R: 5' GTCCTAGTTGATCCTGATTCGACA 3'	AFLP	CAPS	RsaI
M55	F: 5' CAGAAGAAGCTCAAGCCAC 3' R: 5' GCGTAACAAACATTGTTGC 3'	AFLP	AFLP	-
M68	F: 5' ATAACAAGTGTGCGCAGGCAAGCC 3' R: 5' TGCTTCTGAAATCGGTATTGATAGTCC 3'	AFLP	AFLP	-
M73	F: 5' ACCTGGTGGTCTTCGTAATA 3' R: 5' GATTCCAAATTCAAAGCAAT 3'	SNP	CAPS	SmaI
M90	F: 5' TTCTAAGCATCGGGAAGTTT 3' R: 5' ATAGTGAATCGCTGGTACA 3'	AFLP	CAPS	ApoI
M94	F: 5' TGATATGATTCGATCAGAAG 3' R: 5' TCGGAATATTACTGTTGTCA 3'	SNP	CAPS	HhaI
		AFLP		

2b.táblázat

A markerek térképhelyzete a kloroplaszt DNS-n a 4. ábra látható, a megadott térképpozíciók a *Mt* NC\_003119 szekvenciának felelnek meg, kivéve az M55 markert, amelynek nincs megfelelője *Medicago truncatula*-ban (AF237707).



**4.ábra:** *MsRY* kloroplaszt markerek elhelyezkedése

Fajtánként 10 - 20 egyedből DNS-t izoláltunk, és a RegenSY-ra kialakított kloroplaszt specifikus markerek segítségével jellemeztük a növényeket. A kapott eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze, amely megmutatja a kloroplaszt DNS haplotípusok számát a különböző fajtákban.

Fajta	M1	M39	M55	M68	M73	M90	M94
Adél	1 (20)	2 (12)	6 (19)	2 (22)	1 (12)	1 (20)	1 (20)
Alex	1 (20)	3 (12)	5 (13)	2 (14)	1 (11)	1 (20)	4 (10)
Anna	1 (20)	3 (12)	4 (12)	3 (12)	1 (10)	1 (20)	3 (10)
Hunor	1 (20)	4 (12)	5 (19)	1 (18)	1 (12)	1 (20)	1 (32)
Irisz	1 (20)	3 (12)	4 (12)	2 (14)	1 (11)	1 (20)	2 (11)
Jozsó	1 (20)	3 (12)	4 (19)	1 (12)	1 (12)	1 (20)	1 (12)
Kákai legelő	1 (20)	3 (12)	5 (15)	2 (12)	2 (8)	1 (20)	4 (10)
Kisvárdá	1 (20)	3 (12)	6 (24)	1 (12)	1 (12)	1 (20)	1 (12)
Klaudia	1 (20)	5 (15)	5 (23)	2 (20)	1 (12)	1 (20)	2 (32)
Körös	1 (20)	3 (12)	4 (14)	1 (12)	1 (12)	1 (20)	1 (12)
Lily	1 (20)	3 (10)	4 (13)	2 (15)	1 (12)	1 (20)	2 (10)
KM-Agro	1 (20)	3 (12)	5 (17)	3 (20)	1 (12)	1 (20)	2 (32)
KM-Gyöngy	1 (20)	3 (12)	4 (18)	1 (10)	1 (11)	1 (20)	1 (11)
KM-Norbert	1 (20)	3 (12)	5 (19)	1 (14)	1 (12)	1 (20)	1 (12)
Maraton	1 (20)	3 (12)	3 (15)	1 (12)	1 (13)	1 (20)	1 (12)
Solar	1 (20)	3 (11)	6 (16)	1 (22)	1 (12)	1 (20)	1 (30)
Szapkó	1 (20)	3 (10)	4 (19)	2 (12)	1 (12)	1 (12)	1 (12)
Szarvasi	1 (20)	3 (12)	4 (20)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	1 (12)
Verkó	1 (20)	5 (12)	5 (18)	2 (20)	1 (12)	1 (20)	1 (20)
Viktória	1 (20)	2 (12)	5 (19)	1 (12)	1 (10)	1 (12)	1(12)

**3.táblázat**

### 2.2.3. Megfelelő keresztező partnerek (vonalak) kiválasztása

A kapott eredmények alapján kiválasztottuk azokat a RegenSY-nal szemben polimorfizmust mutató egyedeket amelyeknél minimum 3 marker alapján jól azonosítható polimorfizmust találtunk. A továbbiakban ezeket az egyedeket használtuk keresztező partnerként a SpecR mutánsokhoz.

## 2.3. Keresztezések

### 2.3.1. Mutánsok és keresztező vonalak vegetatív szaporítása

A kloroplaszt öröklésment, azaz a spektinomycin rezisztencia vizsgálatához szükséges tesztpopulációk létrehozásához a mutáns vonalakat és a kereskedelmi fajtákból kiválasztott egyedeket, melyek a kiválasztott kloroplaszt régióban polimorfizmust mutattak a RegenSY-hoz képest vegetatív úton felszaporítottuk (minimum 3 egyed vonalanként).

### 2.3.2. Keresztezések elvégzése

A keresztezéseket manuálisan végeztük, az önbeporzódást az anyanövény virágának etanolos kezelésével akadályoztuk meg (az 51%-os etanol elpusztítja a pollent, de a virág többi része nem szenved károsodást), így az apanövény pollenjét manuálisan a bibére juttatva létrejön a megtermékenyülés és magképződés.

A keresztezésekhez 18 mutáns növényt és 18 kereskedelmi fajtából származó 46 vonalat használtunk. A mutáns vonalak jelölése és a kimutatási módszerek a 4. táblázatban láthatók.

Vonal jelölés	Pozíció	Szekvencia	Mutáció	Restrikciós hely változás	Mutáns vonal
<b>vad típus</b>	<b>1013-1018</b>	CGTCAG			
RY1	1014		CCTCAG	Ddel +	SP131
RY2	1014		CCTCAG	Ddel +	SP151
RY3	1014		CCTCAG	Ddel +	SP1111
RY4	1014		CCTCAG	Ddel +	SP232
RY5	1014		CCTCAG	Ddel +	SP5501
RY6	1014		CCTCAG	Ddel +	SP631
RY7	1014		CCTCAG	Ddel +	SP911
RY8	1014		CCTCAG	Ddel +	SP9601
RY9	1014		CCTCAG	Ddel +	SP1041
RY10	1014		CCTCAG	Ddel +	SP18291
RY11	1014		CCTCAG	Ddel +	SP2491
RY12	1014		CCTCAG	Ddel +	SP24101
RY13	1014		CCTCAG	Ddel +	SP24151
RY14	1014		CCTCAG	Ddel +	SP3531
RY15	1016		CGTAAG	-	SP4251
<b>vad típus</b>	<b>1138-1144</b>	TGACGTC			
RY16	1140		TGTCGTC	AatII-	SP8401
RY17	1141		TGAGGTC	AatII -	SP8301
RY18	1141		TGATGTC	AatII -	SP171

## 4.táblázat

A kereskedelmi fajtákból az Anna és a Lily kivételével legalább 1 vonallal szerepelt minden fajta keresztező partnerként.

Összesen több mint 600 keresztezést végeztünk, azonban magot csak 190 keresztezés eredményezett, amelyekben mutáns növény 101-ben szerepelt anyaként, míg 89-ben apaként. Az összesítést az 5. táblázat mutatja.

	<b>Mutáns anya x vad típusú pollen</b>	<b>Vad típusú anya x mutáns pollen</b>	<b>Összes</b>
Összes keresztezés	101	89	190
Magok száma	2316	2589	4905

## 5. táblázat

A magok száma keresztezésenként erősen változott, találtunk „jó” kombinációkat, amelyek nagyszámú magot eredményeztek, míg voltak „rossz” kombinációk, amelyekből többszöri próbálkozásra sem tudtunk magot fogni. A kloroplaszt öröklődésének szempontjából kiértékelhető keresztezésnek ítéltük azokat, amelyekből legalább az egyik irányú keresztezésben minimum 10 magot nyertünk. A magokat kénsavas kezelés után steriliztük, majd vizes agaron csíráztattuk. A csíranövényeket Jiffy-ben növesztettük, és csak a DNS izoláláshoz szükséges mintavétel után (a második valódi levelek megjelenése után) kerültek kiültetésre az üvegházba.

### 2.3.3. Keresztezések kiértékelése

A keresztezések kiértékeléséhez az utódnövényekből DNS-t izoláltunk, a megfelelő primerekkel PCR-t végeztünk és az összes F1 utódban azonosítottuk a spektinomycin rezisztencia markert a második kifejlett levélben. Néhány keresztezésben több mintát és több markert is analizáltunk. Összesen 18 SpecR mutáns RegenSY vonal és 18 kereskedelmi fajta 46 kiválasztott vonalának keresztezéséből származó utódot vizsgáltunk meg a mutáció szempontjából. Az eredményeket az 6. táblázatban tüntettük fel.

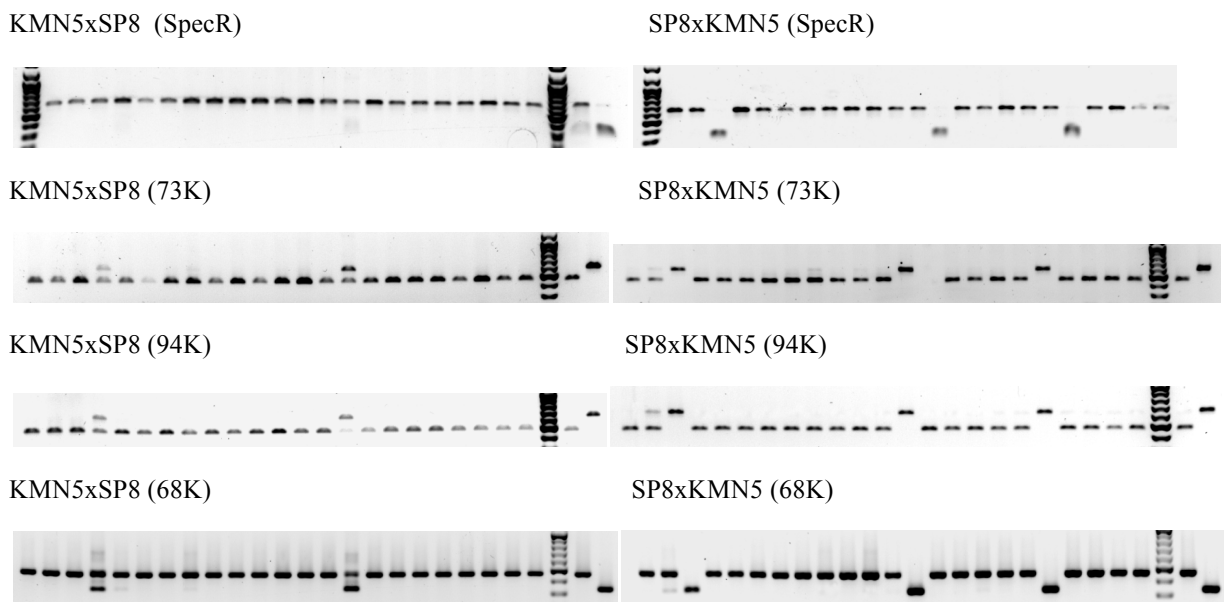
<b>Keresztezés</b>						<b>Reciprok keresztezés</b>						
<b>Szülők</b>		<b>F1 utódok genotípus</b>					<b>Szülők</b>		<b>F1 utódok genotípus</b>			
Anya	Pollen	M	P	M+P	Σ		Anya	Pollen	M	P	M+P	Σ
<b>Adél 120</b>	RY6		18		18		<b>RY6</b>	Adél 120	15	1		16
<b>Adél 125</b>	RY1	2	8		10		<b>RY1</b>	Adél 125	7	5	3	15
<b>Alex 96</b>	RY13	2	11	1	14		<b>RY13</b>	Alex 96	8	5	1	14
<b>Hunor 152</b>	RY13	1	34	1	36		<b>RY13</b>	Hunor 152	11	11	3	25
<b>Írisz 18</b>	RY5		20		20		<b>RY17</b>	Írisz 18	10	8		18
<b>Írisz 224</b>	RY8	1	11	1	13		<b>RY8</b>	Írisz 224	7	4	2	13
<b>Jozsó 10</b>	RY5, RY12, RY15, RY17	7	13	1	21		<b>RY5, RY12, RY15, RY17</b>	Jozsó 10	12	11	5	28
<b>Jozsó 31</b>	RY15, RY17	5	7		12		<b>RY5, RY15, RY17</b>	Jozsó 31	8	2	1	11
<b>Kákai legelő 76</b>	RY17	1	11	1	13		<b>RY17</b>	Kákai legelő 76	9	7	1	17
<b>Kisvárdá 26</b>	RY1, RY3, RY5, RY15, RY17	4	26	1	31		<b>RY1, RY3, RY17</b>	Kisvárdá 26	16	12	1	29
<b>Kisvárdá 270</b>	RY4		10	1	11		<b>RY4</b>	Kisvárdá 26	14	3		17
<b>Klaudia 166</b>	RY17	6	11	2	19		<b>RY17</b>	Klaudia 166		30	2	32
<b>Klaudia 179</b>	RY7	6	11		17		<b>RY7</b>	Klaudia 179	6	12	4	22
<b>KMA 14</b>	RY17		11		11		<b>RY9, RY17</b>	KMA 14	5	3	5	13
<b>KMA22</b>	RY11	5	14		19		<b>RY11</b>	KMA22	4	7		11
<b>KMG 191</b>	RY7	2	10		12		<b>RY7</b>	KMG 191	4	3	3	10

<b>KMG201</b>	RY13, RY16	8	8		16	<b>RY16</b>	KMG201	7	2	2	11
<b>KMN 5</b>	RY15, RY17	4	34		38	<b>RY17</b>	KMN 5	22	5	2	29
<b>KMN 20</b>	RY11, RY17		40	1	41	<b>RY11, RY17</b>	KMN 20	13	21	5	39
<b>KMN 23</b>	RY15, R Y17		35		35	<b>RY15</b>	KMN 23	7	6		13
<b>Körös 217</b>	RY4, RY18	7	4	2	13	<b>RY4, RY18</b>	Körös 217	7	2	1	10
<b>Maraton 349</b>	RY8, RY17	3	13		16	<b>RY8, RY17</b>	Maraton 349	6	3	1	10
<b>Solar 1</b>	RY1, RY3, RY9	6	34	2	42	<b>RY3, RY9</b>	Solar 1	24	14	6	44
<b>Solar 2</b>	RY6, RY17	3	15		18	<b>RY6, RY17</b>	Solar 2	10	15	3	28
<b>Solar 36</b>	RY17		15		15	<b>RY17</b>	Solar 36	7	6		13
<b>Solar 43</b>	RY9, RY10, RY17	2	41		43	<b>RY9, RY10, RY17</b>	Solar 43	18	16	2	36
<b>Solar 44</b>	RY6	1	11	1	13	<b>RY5</b>	Solar 44	10	4		14
<b>Solar 51</b>	RY17		14		14	<b>RY17</b>	Solar51	4	6	1	11
<b>Solar 52</b>	RY17		15		15	<b>RY17</b>	Solar52	8	7	3	18
<b>Solar 61</b>	RY9, RY17	3	25	1	29	<b>RY9, RY17</b>	Solar 61	10	11	3	24
<b>Solar 63</b>	RY5, RY9	3	21		24	<b>RY5, RY9</b>	Solar 63	12	9	3	24
<b>Solar 64</b>	RY7, RY17	6	4	2	12	<b>RY7</b>	Solar 64	5	5	5	15
<b>Solar 65</b>	RY14		12		12	<b>RY8, RY14</b>	Solar 65		10	2	12
<b>Solar 71</b>	RY7	1	11	1	13	<b>RY7</b>	Solar71	3	9	3	15
<b>Szapkó 8</b>	RY15, RY17		16		16	<b>RY15, RY18</b>	Szapkó 8	7	8		15
<b>Szapkó 57</b>	RY1, RY15, RY18	8	40	1	49	<b>RY1, RY15, RY18</b>	Szapkó 57	26	22	9	57
<b>Szarvasi 316</b>	RY3	11	16	3	26	<b>RY3</b>	Szarvasi 316	14	7	2	23
<b>Szarvasi 327</b>	RY10, RY17	5	14	2	21	<b>RY10, RY17</b>	Szarvasi 327	11	7	1	19
<b>Verkó 305</b>	RY11		11		11	<b>RY11</b>	Verkó 305		4		4
<b>Verkó 313</b>	RY18		8		8	<b>RY15, RY18</b>	Verkó 313	22	5	1	28
<b>Viktória 63</b>	RY9		2	2		<b>RY9</b>	Viktória 63	6	2		8

**6.táblázat**

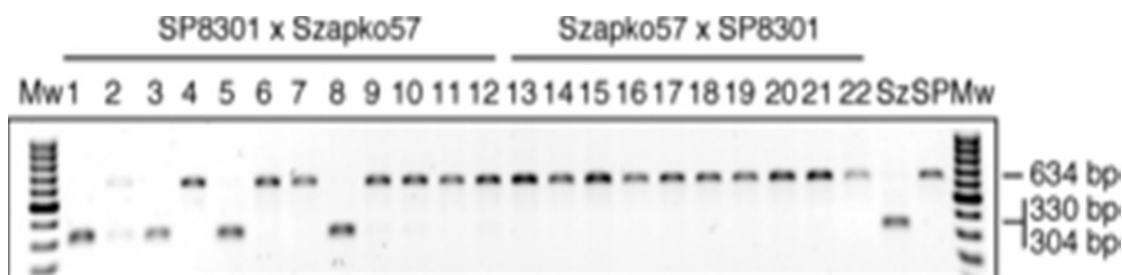
Az első teljesen kiértékelt keresztezés az Sp8 x Solar1 keresztezés volt. Ebben a keresztezésben az F1 növényekben végigkövettük a kloroplaszt mutációt mindkét sziklevélben, a vitorlában, az első és második levélben és a kifejlett növényben (1 éves) is, és megvizsgáltuk az F2 egyedeket, mind a spectinomycin rezisztenciára, mind pedig más kiválasztott markerekre. Az F1-ben anyai és apai kloroplasztot hordozó egyedeket is találtunk mind a kétirányú keresztezésben, sőt néhány egyedben a vad és a mutációt hordozó kloroplaszt is kimutatható volt ugyanabban a növényben, a sziklevélben, a vitorlában és a kifejlett második levélben is. Az 1 éves növényeket vizsgálva azonban minden esetben már csak az egyik típusú kloroplaszt volt kimutatható. Az Sp8 x Solar1 keresztezés utódaiban az egy éves növényeket vizsgálva, az F1-ben 8 anyai és 6 apai típusú kloroplasztot hordozó növényt találtunk, míg a reciprok keresztezésben 14 apai és 1 anyai típus fordult elő. A fiatal növényként kevert kloroplaszt populációt hordozó növényekből származó F2 egyedekben a SpecR mutációt vizsgálva azt találtuk, hogy ezekben a növényekben már csak az 1 éves F1 egyedekre jellemző típusú kloroplasztot tudtuk kimutatni. A másik két keresztezés (Sp8301 x Szapkó57 és Sp8 x KMN5), amelyet szintén több markerrel értékeltünk hasonló eredményt adott. Az 5. ábrán az Sp8xKMN5 keresztezés négy polimorf markerrel történt kiértékelése látható.





**5.ábra**

Az először kiértékelt keresztezések közül a Szapko57 x SP8301 keresztezésben azt tapasztaltuk, hogy a RegenSY-ből izolált SpecR mutáns vonal a reciprokkeresztezésben nem azonosan viselkedett, anyaként biparentális öröklődést mutatott, azaz az utódok között anyai, illetve apai kloroplaszt típust hordozó egyedek is megjelentek (1-12), míg ha pollen donorként szerepelt a keresztezésekben az utódok csak apai fenotípust (13-22) mutattak (6. ábra). Találtunk olyan egyedet is, amely mindkét szülőre jellemző kloroplasztot tartalmazott (heteroplasztomikus egyed: 2).



**6.ábra**

A könnyebb áttekinthetőség kedvéért a 7. táblázatban összesítettük a kloroplaszt genotípus vizsgálatok eredményeit.

	Mutáns anya x vad típusú pollen	Vad típusú anya x mutáns pollen	Összes
Keresztezések száma	74	79	153
Magok száma	787	781	1566
Anyai típus	443	121	564
Apai típus	282	636	918
Biparentális (M+P)	62	24	6

**7.táblázat**

Az adatok az első, részletesen kiértékelt három keresztezéshez hasonló eredményt mutattak. A RegenSY-ból származó mutánsok, ha a keresztezésekben anyanövényként szerepelnek, utódai mind az anyai, mind az apai kloroplaszt típust hordozzák, de az anyai típus gyakoribb, a különböző keresztezések eredményeit összesítve az arány 2:1. Ezzel szemben, ha a mutáns növény a pollen donor az utódok között sokkal gyakoribb az apai, azaz a mutáns típus, az arány ebben az esetben 5:1 az apai genotípus javára. Azonban találtunk olyan vonalakat, amelyekkel szemben a keresztezésekben az általunk izolált mutáns akár anyaként, akár pollen donorként szerepelt minden esetben dominálón a mutáns kloroplaszt genotípus jelent meg az utódok között (Adél120, KMN5, Verkó313).

### 3. A pályázati eredmény értékelése

A projektben azt vállaltuk, hogy meghatározzuk a kloroplaszt öröklésének módját a tetraploid *Medicago sativa*-ban és megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy a rendszer alkalmas-e kockázatmentes környezetbiztonsági vizsgálatok végzésére.

Munkánk során 31 spontán SpecR mutánst izoláltunk *Medicago sativa* RegenSY vonalból, amelyből 27 fenotípusosan azonosnak bizonyult a kiindulási vonallal. Ezek a mutációt stabilan és 100%-ban örökítik utódaikra, ami igazolja, hogy a vonalak homoplasztómikusak. Meghatároztuk a mutációt hordozó vad típusú régió szekvenciáját és ezt a mutáns szekvenciákkal együtt a Génbankban (NCBI) közzétettük. A keresztezésekhez szükséges partnerek kiválasztása során először *Medicago sativa* kloroplaszt vizsgálataiban alkalmazható polimorf markereket azonosítottunk, majd ezek segítségével 20 kereskedelmi fajtát vizsgáltunk meg. A markerek között találtunk erősen konzervatívokat, és nagyfokú változatosságot mutató markereket is. A fajták között a polimorfizmusok nagyfokú különbséget mutattak, ami további markerek fejlesztése után, esetleg fajtaazonosításban/fajtavédelemben alkalmazható lehet. A kereskedelmi fajtákból kiválasztott egyedekkel és a mutáns vonalakkal végzett páronkénti, reciprok keresztezésekben származó magokban (F1) vizsgáltuk a kloroplaszt öröklését, amivel modellezni kívántuk a GM pollenen keresztül történő kloroplaszt terjedést lucernában. Néhány keresztezést részletesen kiértékeltünk, a sziklevelettől a kifejlett növényig, több markerre nézve is. Sőt néhány növény F2 utódait is megvizsgáltuk. A kapott eredmények alapján a keresztezések zömét azonban már csak egy markerre értékeltük (SpecR). Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált keresztezésekben a kloroplaszt markerként használt spektinomycin rezisztencia mind anyai, mind apai úton öröklődhet, ami megfelel a *Medicago sativa* kloroplaszt örökléséről eddig közölt irodalmi adatoknak. A kiértékelt keresztezésekben azt figyeltük meg, hogy azokban a keresztezésekben, amelyekben valamelyik RegenSY SpecR mutáns az apanövény ott az utódokban nagyobb számban találunk apai típusú kloroplasztokat, tehát a RegenSY esetében erős apai dominanciáról beszélhetünk. A reciprok keresztezésekben mind anyai, mind apai típusú kloroplasztot találtunk az utódokban, különböző arányokban. A részletesen kiértékelt keresztezésekben azt a következtetést is levontuk, hogy az eredetileg kevert kloroplaszt populációt hordozó sejtekben a kevert (heteroplasztisz) jelleg nem stabil, ezért előbb-utóbb homoplasztómikussá válnak, vagyis vagy az egyik, vagy a másik plasztisz-populáció marad fenn tiszta formában. Három olyan keresztező partnert találtunk, amely kis hatékonysággal örökíti át kloroplasztjait az utódaikra, akár anyaként, akár apaként szerepel a SpecR mutáns vonallal szemben a keresztezésekben. Ezeknek a vonalaknak - a jelenség genetikai alapjainak tisztázása és egy kloroplasztot nem átadó vonal kifejlesztése után - nemesítési alapanyagként lehet jelentősége. Vizsgálataink alapján állíthatjuk, hogy a kloroplaszt mutációk alkalmasak GM növények helyettesítésére környezeti kockázat becslési modellek kísérletekben. Tetraploid lucerna esetében az öröklésmechanizmust nem ismerjük, bár az általunk

talált korlátozott átviteli képesség néhány vonalnál illetve az apai dominancia a RegenSY vonal esetében lehetőséget adhat ennek részletesebb megismerésére.

Eredményeinkből eddig 1 publikáció jelent meg, és egy másik kézirat hamarosan beküldésre kerül. Öt hazai és egy nemzetközi konferencián és MBK rendezvényen prezentáltuk eredményeinket. Ezekon kívül két OTDK dolgozat született a pályázat során, amelyekből az egyik országos 3. helyezést ért el, egy MSc diplomadolgozat már megvédésre került és egy BSc dolgozat írása van folyamatban.

#### **4. Költségterv eltérés indoklása**

A beruházási költség átcsoportosítását a dologi költség rovatba a nagyszámú szekvenálás költségének fedezése tette szükségessé.

#### **5. A kutatás eredményeinek hasznosíthatósága és szellemi tulajdon védelme**

Hasznosítható eredmény csak további kutatás során hozható létre, ilyen lehet a kloroplaszt polimorfizmusok alkalmazása a fajta azonosításban vagy fajtavédelemben (nem csak lucerna esetében). Illetve a korlátozott kloroplaszt átvivő lucernavonal kifejlesztése, ami nemesítési alapanyagként a lucernanemesítésben alkalmazható.