



**Epigenetikai vizsgálatok -
avagy beleharaphatunk e
ugyanabba az almába
kétszer?**

Gulyás Andrea

In vitro mikroszaporítás jelentősége alma esetében



- Hagyományos úton: vegetatív szaporítás, klónozás
- Mára üzemi szaporítási technológia az *in vitro* módszerek
- Vírus és egyéb kórokozóktól mentes szaporítóanyag előállítása
- Egyöntetű szaporítóanyag előállítása
- Szaporodási ráta növelése
- Szaporítóanyag előállítása évszaktól, helytől, klímától függetlenül
- Termőhelynek és termesztési célnak legmegfelelőbb fajták felszaporítása

Nemesítés során előállított új fajták, nemesítési vonalak gyors felszaporítása

Számos alma alany és nemes fajta axilláris hajtásfejlődésére vagy járulékos hajtásregeneráció kidolgozott módszerek



Az *in vitro* mikroszaportás és az epigenetika kapcsolata

- Szomatikus embriogenezis és regenerációs folyamatok
- Metilációs változások ismerete lehetővé teszik a jobb *in vitro* módszerek kidolgozását
- *MET1* (DNA metiltranszferáz 1) gén – sejtenyészet kultúrákban
- *DRM1*, 2 és *KYP* gén – kallusz
- *LEC1* és *LEC2* gének – auxin mentes táptalaj
- *JMJ14* gén – hiszton metilációja *in vitro* regenerált növényekben
- *SERK* gén – szomatikus embriogenezis során



Szomaklonális variabilitás

- ▶ *In vitro* körülmények variabilitást indukálhatnak
- ▶ Mutagén ágensek, különböző hormonkoncentrációk
- ▶ Molekuláris növénynemesítés
- ▶ Molekuláris markerekkel történő szelekció
- ▶ Új variánsok, mutánsok nemesítési alapanyagként felhasználása
- ▶ Metilációs profil változása a nukleotid sorrendben nem okoz változást

DNS metilációs vizsgálatok jelentősége, lehetőségei

- ▶ Jobb *in vitro* szaporítási módszerek kidolgozása
- ▶ Nehezebben indítható kultúrák esetében növelheti a totipotens sejtek indukálásának lehetőségeit
- ▶ Metiláció érzékeny restrikciós enzimek
- ▶ MSAP módszer
- ▶ Biszulfid kezelés: genom szekvenálás (WGBS, RRBS); Array (Affymetrix, Agilent, Illumina Bead)
- ▶ Real-time PCR (qPCR): MethyLight

Kutatás célja

- DE AKIT Nyíregyházi Kutatóintézet
- SZIE MKK Genetikai, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet
- Több mint 20 éve *in vitro* fenntartott McIntosh és Húsvéti rozmaring
- DNS metilációs profil megalkotása, bázissorrend változás meghatározása
- *In vivo* anyanövény – *In vitro* tenyészet - *in vitro* akklimatizált növény



Anyag és módszer

- ▶ Genomiális DNS
- ▶ Alma mikroszatellit markerek – Cy5 fluoreszcens festék
- ▶ ALF-Express II automata lézer fluorométer
- ▶ Biszulfid kezelt teljes genom új generációs szekvenálása



Mikroszatellit markerek eredményei

Primer neve	Fajta					
	Húsvéti rozmaring anyanövény	Húsvéti rozmaring in vitro	Húsvéti rozmaring akklimatizált	McIntosh anyanövény	McIntosh in vitro	McIntosh akklimatizált
CH01f02	170:184	170:184	170:184	174:206	174:206	174:206
CH01h01	112	112	112	114:116	114:116	114:116
CH01h02	203:206	203:206	203:206	249	249	249
CH02c02	171:185:191	171:185:191	171:185:191	179:183	179:183	179:183
CH02c06	216:220:252	216:220:252	216:220:252	230:254	230:254	230:254
CH02c09	241:247	241:247	241:247	231:255	231:255	231:255
CH02c11	222:232	222:232	222:232	226	226	226
CH02d08	211:217	211:217	211:217	211:229	211:229	211:229
CH03a02	135:145	135:145	135:145	119:157	119:157	119:157
CH03g07	119:129	119:129	119:129	126:166	126:166	126:166
CH04e03	193:197:203	193:197:203	193:197:203	185:199	185:199	185:199
CH04e05	174:182	174:182	174:182	184:204	184:204	184:204
CH04g10	135:135	135:135	135:135	139:143	139:143	139:143
CH05c02	168:172	168:172	168:172	168:168	168:168	168:168
CH05c04	185:207	185:207	185:207	207	207	207
CH05d11	187:195:205	187:195:205	187:195:205	173:175	173:175	173:175
CH05e03	162:172:190	162:172:190	162:172:190	162	162	162

Metilációs profil eredményei

		25% feletti metilációs változás	Legnagyobb változású gének (60% feletti)	Mennyi gén nem változott	0 % metiláltságú gének száma	100% metiláltak	Genom génenkénti metilációs %-ának átlaga (CpG)	Genom metilációs %-a (CpG)	Genom metilációs %-a (CHG)	Genom metilációs %-a (CHH)
McIntosh	Akklimatizált növény	105	4	86	614	27	28,79	59,6	43,8	10,4
	In vitro növény				536	27	29,24	47,9	33,3	8,4
	In vivo anya növény				427	19	29,6	60	42	9
Húsvéti rozmaring	Akklimatizált növény	78	2	89	517	31	30,33	61,2	42	8,9
	In vitro növény				535	23	30,76	48,5	33	7,9
	In vivo anya növény				412	22	30,45	62	44,1	10,3
McIntosh és Húsvéti rozmaring	McIntosh akklimatizált növény	1026	117	10	575	23				
	McIntosh in vitro növény				503	19				
	McIntosh in vivo anya növény				414	10				
	Húsvéti rozmaring akklimatizált növény				485	23				
	Húsvéti rozmaring in vitro növény				521	15				
	Húsvéti rozmaring in vivo anya növény				402	18				

Beleharaphatunk e kétszer
ugyanabba az almába?

