

Genetikai stabilitás és génexpressziós vizsgálatok alma hajtástenyészetekben

GULYÁS ANDREA¹, DOBRÁNSZKI JUDIT¹, KISS ERZSÉBET², HIDVÉGI NORBERT¹

¹Debreceni Egyetem Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság, Nyíregyházi Kutatóintézet

²Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Genetikai,
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Intézet

E-mail: gulyas.andrea@agr.unideb.hu

Összefoglalás

Az epigenetika a gén expressziójában vagy a sejtek fenotípusában bekövetkező változás, amely a mitózis vagy meiózis során következhet be és nem okoz DNS-szekvencia változást. Kémiai csoportok kapcsolódhatnak a DNS-hez, aminek következtében módosulhat a gén aktivitása. Az eukarióták egyedfejlődését kísérő ilyen „genetika fölötti” ún. epigenetikai változások az *in vitro* növényi tenyészetekben is történnek. Epigenetikai módosulások szabályozzák a szomatikus embriogenezist, az organogenezist a regenerációs folyamatok során. Felléphetnek azonban mikroszaporítás céljából létrehozott *in vitro* hajtástenyészetekben is a táptalaj-komponensek, a fenntartási körülmények hatására. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy több évtizedes *in vitro* hajtástenyészetek mikroszatellit (SSR) és transzkriptom profil mintázata azonos vagy eltérő-e a kiinduló (anya) növényekhez képest, illetve az esetleges változások visszaalakulnak-e az akklimatizáció során. A kutatásaink alapanyagául ‘McIntosh’ és ‘Húsvéti rozmaring’ almafajtákat használtunk. Az anyanövények és a több mint 20 éve hajtástenyészetben fenntartott *in vitro* növények genetikai azonosságát mikrosatellit markerekkel, a gének expressziós mintázatát RT-qPCR (reverz transzkripció kuantitatív polimeráz láncreakció) segítségével határoztuk meg 65 kiválasztott gén esetében, melyek az előzetes vizsgálataink alapján szignifikánsan eltérő DNS metilációs szinteket mutattak. DNS-szekvencia-változást nem tapasztaltunk, ugyanakkor a vizsgált gének esetében génexpressziós különbségeket mutattunk ki, amelyek negatív korrelációban állnak az adott DNS-szakasz metilációs szintjével.

Kulcsszavak: alma, epigenetika, génexpresszió, mikroszatellit marker, RT-qPCR

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A növényi *in vitro* mikroszaporításon a növényi szomatikus sejtek, valamint szervek tenyésztését és teljes növénné regenerálását értjük, azzal a céllal, hogy a kiindulási növényekkel azonos genotípusú utódnövényeket állítsunk elő a hagyományos szaporítási módokhoz viszonyítva a lehető legrövidebb időn belül és nagy egyedszámban. Mikroszaporítással egész évben folyamatosan biztosítható a szükséges vírus- és kórokozómentes növény az évszaktól, helytől és klímától függetlenül. Az *in vitro* mikroszaporítás arra is lehetőséget ad, hogy a termőhelynek és termesztési célnak legmegfelelőbb fajtákat felszaporíthassuk. Az alma esetében számos kidolgozott módszer van az alany és nemes fajta axilláris hajtásfejlődésére vagy járulékos hajtásregenerációjára (Dobránszki és Teixeira da Silva 2010).

Ugyanakkor felmerülhet a kérdés, hogy a környezeti hatások okoznak-e, és ha igen, milyen módosulásokat idéznek elő a genetikai állományban, számítanunk kell-e epigenetikai szabályozás következtében fellépő génexpressziós változásokra (Quadrana és Colot 2016).

Az epigenetikai változások, beleértve a DNS és hiszton-fehérjék metilációját, befolyásolhatják a DNS működését, az RNS átírást az *in vitro* nevelés folyamán. Különböző metilációs állapotok előfordulhatnak a szomatikus embriogenezis és regenerációs folyamatok során is, melyek génexpressziós változásokat eredményezhetnek a növényi szövettenyésztés során, de felléphetnek az *in vitro* mikroszaporítás során és a génbanki céllal fenntartott hajtástenyészetekben is (Dudits és Heszky 2000). A metilációs változások molekuláris szintű megértése hozzájárulhat az *in vitro* kultúrák esetében egy jobb növénynevelési stratégia kidolgozásához, ami a rekalcitráns növényfajok esetében növelheti a sejtekből történő hajtásregeneráció indukálásának lehetőségeit (Karim et al. 2016).

A mikroszatellit markerek (SSR, Simple Sequence Repeat) 1-10bp hosszú tandem ismétlődések, melyek a prokariotákban és eukariotákban találhatóak (Vieira et al. 2016). Az egész genomban széles körben elterjedtek, különösképpen az eukarioták eukromatinjában, illetve a kódoló és nem kódoló nukleáris és organelláris DNS-ben (Pérez-Jiménez et al. 2013; Phumichai et al. 2015). Napjainkban több, mint 300 alma SSR marker áll a kutatók rendelkezésére (<http://www.hidas.unimi.it>). Guilford és munkatársai (1997) voltak az elsők, akik SSR markereket alkalmaztak az almában és 21 fajtát sikerült azonosítaniuk vele. Magyarországon Galli és munkatársai (2005) 66 kereskedelmi almafajtát jellemeztek 6 mikroszatellit lókuszbán. Modgil és munkatársai (2005) RAPD (Random amplified polymorphic DNA) primerekkel MM106 alma *in vitro* és anyanövényeket vizsgáltak. Összesen 129 értékelhető fragmentumot kaptak, melyből 18 volt polimorf minden vizsgált egyedben. Pathak és Dhawan (2012) elsőként bizonyították, hogy az *in vitro* mikroszaporított alma minták (Merton 793) genetikailag stabilak, amit ISSR marker analízissel támasztottak alá. Jin és munkatársai (2014) 'Pingyitiancha' (*Malus hupehensis* var. *pinyiensis*) alma *in vitro* és anyanövényt hasonlítottak össze SSR markerekkel, melyekkel egyöntetű monomorf mintázatokat kaptak, bizonyítva, hogy genetikailag nincs különbség a kiindulási anyag és a regeneránsok között. Kohpiai és munkatársai (2017) szomaklonális variabilitást azonosítottak az *Ananas comosus* (ananász) *in vitro* és anyanövények között, morfológiai, sejtszintű és biokémiai megfigyelések alapján, melyeket ISSR markerekkel történő polimorfizmus vizsgálattal is bizonyítottak. Butiuc és

munkatársai (2019) különböző növénygyűjteményekből származó almamintákat vizsgáltak SSR markerekkel. Azt a megállapítást tették, hogy a CH03g07, CH05c02, CH05d11 és CH05e03 primerpárokkal alacsony szintű polimorfizmust kaptak. Ez a kísérlet rámutatott arra, hogy az *ex situ*, mikroszaporított és krioprezerválás után visszanyert növények között nincs lényegi különbség a DNS-szekvenciában.

Korábbi kutatásunkban a 'McIntosh' és 'Húsvéti rozmaring' almafajták DNS metilációs szintjeit határoztuk meg, *in vitro*, akklimatizált és anyanövényben. Kimutattuk, hogy a globális DNS metilációs szintben nincs szignifikáns eltérés, míg a génrégiónok CpG, CHG és CHH kontextusaiban szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. Megállapítottuk, hogy összességében 65 génrégión fordul elő, melyek DNS metilációs szintje a CpG, CHG és CHH kontextusokban szignifikánsan eltérő (Gulyás et al. 2019).

Kutatásunk célja az volt, hogy kimutatható-e genetikai különbség és génexpressziós változás a DE AKIT Nyíregyházi Kutatóintézetében több mint 20 éve fenntartott 'McIntosh' és 'Húsvéti rozmaring' almafajták anyanövényei, *in vitro* tenyészteti és akklimatizált *in vitro* növényei között kimutatható-e genetikai különbség és génexpressziós változás a 65 vizsgált génrégiónban.

Anyag és módszer

Genomi DNS- és össz RNS-izolálás

Két olyan almafajtát vizsgáltunk ('Húsvéti rozmaring', 'McIntosh'), amelyet a Debreceni Egyetem AKIT Nyíregyházi Kutatóintézetében már több mint 20 éve fenntartanak *in vitro* hajtástenyésztetben. Összesen 6 növényt vizsgáltunk meg három biológiai és technikai ismétlésben a PCR és RT-qPCR vizsgálatok során.

Liofilizált *in vitro* és *in vivo* levélmintákból genomi DNS-t izoláltunk a NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Németország) használatával a gyártói utasításokat alkalmazva. Az izolált DNS minőségét gélelektroforézissel (Clever Scientific Ltd., Warwickshire, Egyesült Királyság) és mikrokapilláris spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific NanoDrop ND-1000) ellenőriztük. A DNS-mintákat mikroszatellit markerekkel teszteltük. Az össz RNS-izolására Direct-zol™ kitet (Zymo Research, Irvine, CA, Egyesült Államok) alkalmaztunk, melyhez TRIzol reagenst adtunk. Az így kapott össz RNS-mintákat Implen n50 mikrokapilláris spektrofotométerrel (Implen, Munich, Németország), gélelektroforézissel (Clever Scientific Ltd., Warwickshire, Egyesült Királyság) és Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, Egyesült Államok) fragmentum analízátorral ellenőriztük.

Alma mikroszatellit markerek

A PCR-t iCycler (Bio-Rad) készülékekben végeztük 15 µl végtérfogatban. A reakcióhoz 20 ng genomi DNS-t használtunk templátként, PCR Master Mixet (2x) (Thermo Fisher Scientific) 0,75 µl forward és reverse SSR primert (10 µM törzsoldatból) mértünk be a reakcióhoz. A reakció körülmények a következők voltak: 5 perces 95°C-os előciklus után 30 másodperc 95°C, 30 másodperc 57°C és 1 perc 72°C lépések következtek 35x ismételve, majd 5 perces 72°C-on történő utópolymerizációt állítottunk be. A mikroszatellit allélek hosszának meghatározásához

ALF-Express II készüléket használtunk, amely automatikusan detektálja a fluoreszcensen jelölt DNS-fragmentumokat poliakrilamid gélelektroforézis közben. Az ALFwin Fragment Analyser 1.00 szoftverrel értékeltük az eredményeket. A mintákat 8%-os poliakrilamid gélen (ReproGel TM High Resolution, GE Healthcare BioSciences) futtattuk. A pontos allélméret meghatározása céljából a forward primereket Cy5 fluoreszcens festékkel jelöltük meg. A belső standardok az SSR elemzésben 95 bp, 275 bp és/vagy 300 bp méretűek voltak. Külső standardként pedig 95 bp és 300 bp méretű fragmentumokat használtunk. A kutatás során használt mikroszatellit primerek: CH01f02, CH01h01, CH01h02, CH02c02, CH02c06, CH02c09, CH02c11, CH02d08, CH03a02, CH03g07, CH04e03, CH04e05, CH04g10, CH05c02, CH05c04, CH05d11, CH05e03 (Liebhard et al. 2002).

RT-qPCR vizsgálatok

Az össz RNS-mintákból 120 ng mennyiséget adtunk a cDNS szintézishez, melyet a FIREScript RT cDNA Synthesis MIX (Solis BioDyne, Tartu, Észtország) kittel szintetizáltunk. A qPCR-hez 5 × HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne) reagenst használtunk a gyártó utasítása szerint. Az RT-qPCR vizsgálatokat AriaMX (Agilent) készüléken végeztük el. A qPCR vizsgálatokhoz a Gulyás és munkatársai (2019) cikkben azonosított 72 szignifikánsan eltérő metilációs szintű génrégiókat választottuk ki (65 gén), melyekre a CLC Main Workbench programmal primereket terveztünk.

Adatok értékelése és statisztika

Az RT-qPCR eredményeket AriaMx Software (Agilent) segítségével határoztuk meg a Ct értékeket a kontroll (anyanövény) és kezelt (aklimatizált és *in vitro*) növények esetében. Referenciaként a GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gént használtuk. Microsoft Excel programmal számítottuk ki a gének Logarithmic Fold Change (LFC) értékeit a $\Delta\Delta C_t$ érték alapján. A génextpresszió és a DNS metilációs szintek (Gulyás et al. 2019) közötti kapcsolt linearitást Pearson-féle korrelációs tényező kiszámításával bizonyítottuk a 65 vizsgált génrégió esetében.

Eredmények

A mikroszatellit markerekkel kapott eredmények

A 17 mikroszatellit lókuszban nem tapasztaltunk hosszpolimorfizmust az *in vivo*, *in vitro* és az aklimatizált almafajták között. Az eredményeket az [1. táblázatban](#) szemléltetjük.

A génextpressziós eredmények

A [2/a. táblázatban](#) összegeztük a 65 kiválasztott gén RT-qPCR-es vizsgálatait során kapott LFC értékeit a kezelt növényekben, összehasonlítva a CpG kontextussal, valamint a [2/b. táblázatban](#) a CHG és CHH kontextusokkal. A génkifejeződés mértéke a 'McIntosh' aklimatizált növényben a legnagyobb esetben 5,55-ször kisebb intenzitású és 6,1-szer nagyobb intenzitású génextpressziót eredményezett az anyanövényhez képest. A 'McIntosh' *in vitro* növényben a legnagyobb esetben 5,55-ször kisebb intenzitású és 5,81-szer nagyobb intenzitású génextpressziós változást mutatott az

anyanövényhez képest. Ezzel szemben a 'Húsvéti rozmaring' akklimatizált növényben a legnagyobb esetben 5,57-szer kisebb intenzitású és 7,32-szer nagyobb intenzitású génexpressziót eredményezett az anyanövényhez képest. A 'Húsvéti rozmaring' *in vitro* növény génkifejeződésének mértéke a legnagyobb esetben 5,59-szer kisebb intenzitású és 5,39-szer nagyobb intenzitású génexpressziót mutatott, mint az anyanövény. A kiválasztott génekhez tartozó DNS metilációs szintek (Gulyás et al. 2019) és a génexpressziós LFC értékek közötti korrelációs tényezők a CpG kontextusban -0,18, -0,34, -0,018 és -0,17; a CHG kontextusban -0,36, -0,46, -0,15 és -0,36; a CHH kontextusban -0,35, -0,41, -0,30 és -0,38 voltak a 'McIntosh' akklimatizált, 'McIntosh' *in vitro*, 'Húsvéti rozmaring' akklimatizált és 'Húsvéti rozmaring' *in vitro* növények esetében (3. táblázat).

1. táblázat. Alma mikroszatellit allélek hosszmereteinek (bp) összehasonlítása

Vizsgált növények						
SSR marker neve	Húsvéti rozmaring anyanövény	Húsvéti rozmaring <i>in vitro</i>	Húsvéti rozmaring akklimatizált	McIntosh anyanövény	McIntosh <i>in vitro</i>	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

Table 1. Comparison of apple microsatellite allele length (bp)

2/a. táblázat. A 65 kiválasztott gén LFC értékei az RT-qPCR vizsgálatok alapján (negatív érték: kisebb intenzitású géneexpresszió, pozitív érték: nagyobb intenzitású géneexpresszió az anyanövényhez viszonyítva) és a DNS metilációs szintek százalékos értékei a CpG kontextusban

Gén azonosító	RNS				CpG			
	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozsmaring akklimatizált	Húsvéti rozsmaring <i>in vitro</i>	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozsmaring akklimatizált	Húsvéti rozsmaring <i>in vitro</i>
MD00G1006200	-1,66	0,91	-4,09	1,95	34,87	45,23	45,46	58,91
MD00G1046300	1,7	1,5	2,6	2,2	NaN	NaN	NaN	NaN
MD01G1005500	3,29	2,99	3,68	3,59	56,37	57,00	58,74	61,57
MD01G1019100	-5,43	-5,41	-5,49	-5,56	91,07	91,09	92,61	90,27
MD01G1021400	-5,47	-5,41	-5,49	-5,56	NaN	NaN	NaN	NaN
MD02G1125700	0,27	-1,1	0,1	-1,85	NaN	NaN	NaN	NaN
MD02G1175400	-5,41	-5,33	-5,67	-4,51	46,82	47,21	46,22	49,47
MD02G1278400	5,29	4,39	5,25	4,41	50,76	49,86	55,43	55,34
MD03G1180400	4,3	4,1	3,71	3,1	43,34	39,85	35,71	50,30
MD04G1051200	-5,46	-5,39	-5,47	-5,56	NaN	NaN	NaN	NaN
MD04G1190300	-3,41	-4,15	-4,9	-4,6	NaN	NaN	NaN	NaN
MD04G1232400	4,97	4,86	4,83	4,56	43,57	43,43	41,65	43,51
MD05G1031300	5,1	4,72	4,72	4,25	38,14	38,69	34,59	36,12
MD05G1050000	5,1	4,7	5,25	4,36	47,50	47,69	44,53	44,56
MD05G1272000	-3,1	-2,38	-3,98	-3,65	46,79	47,50	43,61	37,85
MD05G1319800	3,1	-4,1	4,6	-0,67	86,38	87,63	46,03	93,87
MD05G1320100	-4,89	0,82	-2,78	-0,54	2,27	3,30	90,10	90,00
MD05G1320500	-5,2	-5,54	3,21	-5,47	87,83	88,01	83,32	91,92
MD05G1320800	-0,6	-4,77	7,32	-5,55	82,51	93,32	55,10	92,28
MD05G1321700	3,87	5,2	3,56	3,89	4,04	2,29	9,56	8,87
MD06G1069300	-1,35	-1,73	-0,1	0,78	80,43	83,92	66,47	67,39
MD06G1077500	1,66	3,5	3,19	1,67	NaN	NaN	NaN	NaN
MD06G1080900	-5,32	-5,14	-5,47	-4,94	36,09	38,01	37,13	35,01
MD06G1098700	-5,41	-5,11	-0,9	-2,59	NaN	NaN	NaN	NaN
MD06G1241300	-5,41	-5,35	-5,47	-5,56	11,36	13,28	17,40	16,25
MD07G1051600	3	3	3,13	3	50,24	44,55	42,47	37,83
MD07G1125500	4,58	4,67	4,59	4,34	45,54	45,24	44,67	48,15
MD07G1239900	-5,37	-5,39	-5,49	-5,56	31,30	33,25	23,25	27,30
MD07G1252700	-5,43	-5,41	-5,45	-5,59	45,12	44,94	41,58	43,90
MD08G1010300	4,21	4,22	4,79	5,39	34,32	33,24	28,05	30,60
MD08G1092600	2,55	2,1	-0,57	0,11	10,97	30,92	9,31	12,81
MD08G1121600	1,16	-5,55	-3,11	-0,65	15,86	18,90	18,64	17,13

Gén azonosító	RNS				CpG			
	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozmaring akklimatizált	Húsvéti rozmaring <i>in vitro</i>	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozmaring akklimatizált	Húsvéti rozmaring <i>in vitro</i>
MD08G1204800	-5,45	-5,43	-5,51	-5,59	NaN	NaN	NaN	NaN
MD09G1203800	-5,39	-5,35	-5,43	-5,55	47,40	46,25	47,02	37,96
MD09G1226200	-2,1	-2,85	-5,34	-5,46	17,97	19,32	37,67	43,51
MD10G1134500	2,24	1,8	-5,45	-5,59	NaN	NaN	NaN	NaN
MD10G1167800	4,59	3,36	4,51	3,19	8,94	11,29	34,15	33,47
MD10G1256900	-5,49	-5,34	-5,37	-3,75	22,88	22,97	24,88	28,44
MD10G1335600	3,2	3,54	3	2,87	22,36	22,87	29,88	29,85
MD11G1004800	2,21	0,65	3,19	1,7	33,95	36,24	29,72	40,22
MD11G1015400	-5,45	-5,34	-5,45	-5,59	15,20	18,23	19,34	18,37
MD11G1094500	3,76	2,81	2,76	1,55	51,81	55,27	54,48	51,22
MD11G1166100	3,41	3,55	4,41	4,25	34,84	34,26	46,04	45,96
MD11G1186700	-5,43	-5,37	-5,51	-5,53	62,83	60,84	48,05	48,39
MD11G1226100	-4,71	-5,36	-5,45	-5,49	NaN	NaN	NaN	NaN
MD11G1314400	1,15	1,37	0,66	0,34	68,46	62,49	40,41	40,69
MD12G1013800	3,51	1,79	3,26	1,86	40,84	42,70	37,79	42,69
MD12G1052100	1,78	1,3	1,55	0,49	32,01	31,82	37,30	34,68
MD12G1076700	-5,55	-5,43	-5,41	-5,51	27,20	29,45	21,30	21,94
MD12G1251400	-4,46	-2,86	-5,47	-5,58	NaN	NaN	NaN	NaN
MD14G1081400	-5,45	-4,5	1,32	0,33	66,30	66,83	60,69	65,35
MD14G1206500	-4,79	-1,23	-4,9	-1,4	12,32	16,74	9,37	7,21
MD14G1232200	6,1	4,1	5,96	3,94	11,48	11,38	13,71	22,86
MD15G1025100	-5,53	-5,29	-5,35	-5,49	NaN	NaN	NaN	NaN
MD15G1077000	3,27	4,64	3,69	4,66	5,33	13,11	6,34	20,82
MD15G1091800	-5,43	-5,37	-5,49	-5,56	NaN	NaN	NaN	NaN
MD15G1348800	5,51	5,81	5,29	-0,34	15,54	20,66	18,74	32,94
MD15G1426800	4,87	4,63	3,66	2,67	44,22	43,12	47,00	47,33
MD16G1094100	5,41	-2,63	-5,41	-4,79	NaN	NaN	NaN	NaN
MD16G1192100	-3,98	-2,39	-2,99	-0,14	29,67	30,26	27,48	28,29
MD16G1203700	-5,45	-5,39	-5,49	-5,54	23,85	23,63	36,49	37,91
MD16G1211900	-5,55	-5,34	-5,49	-5,51	88,27	90,00	62,64	69,98
MD16G1232900	4,87	4,89	4,76	5,19	NaN	NaN	NaN	NaN
MD16G1247200	2,15	1,39	1,81	0,92	41,77	42,23	49,27	51,23
MD17G1115200	-5,45	-5,42	4,55	4,19	96,33	97,37	13,82	13,78

Table 2/a. LFC values of 65 selected genes based on RT-qPCR assays (negative value: down-regulation, positive value: up-regulation compared to control) with DNA methylation levels in percentage in CpG context

2/b. táblázat. A 65 kiválasztott gén DNS metilációs szintjeinek százalékos értékei a CHG és CHH kontextusokban az anyanövényhez viszonyítva

Gén azonosító	CHG				CHH			
	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozsmaring akklimatizált	Húsvéti rozsmaring <i>in vitro</i>	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozsmaring akklimatizált	Húsvéti rozsmaring <i>in vitro</i>
MD00G1006200	NaN	NaN	NaN	NaN	10,35	4,43	11,69	11,65
MD00G1046300	19,23	20,51	19,33	20,23	1,20	1,16	1,62	1,26
MD01G1005500	16,37	18,50	15,19	14,11	2,74	3,20	2,82	2,34
MD01G1019100	NaN	NaN	NaN	NaN	20,71	23,08	27,14	28,31
MD01G1021400	43,91	42,40	42,95	45,64	3,85	1,52	6,02	4,96
MD02G1125700	37,66	38,12	73,15	88,32	4,01	3,93	7,92	8,71
MD02G1175400	29,78	30,63	24,86	29,64	4,51	4,14	5,62	4,13
MD02G1278400	3,83	3,90	2,68	1,61	0,87	0,90	0,58	0,68
MD03G1180400	17,56	23,18	7,21	10,72	3,40	3,06	2,39	2,04
MD04G1051200	NaN	NaN	NaN	NaN	52,62	52,40	59,78	61,63
MD04G1190300	NaN	NaN	NaN	NaN	19,76	22,68	19,56	39,93
MD04G1232400	1,97	1,29	1,01	0,68	0,85	0,68	1,49	1,06
MD05G1031300	1,30	0,78	0,79	1,15	1,03	0,70	0,90	0,81
MD05G1050000	1,74	1,97	1,34	1,12	1,47	2,20	2,02	0,64
MD05G1272000	27,75	29,61	14,03	20,67	2,28	2,38	1,48	3,13
MD05G1319800	79,84	85,49	33,21	85,27	14,57	8,31	17,29	15,31
MD05G1320100	2,05	4,15	88,56	89,45	0,42	11,43	14,60	14,05
MD05G1320500	75,03	79,99	77,27	80,92	9,84	14,34	18,10	11,15
MD05G1320800	72,17	84,81	46,96	80,63	13,88	10,29	15,14	16,18
MD05G1321700	0,81	0,86	0,50	0,87	1,18	0,99	0,77	0,91
MD06G1069300	45,52	48,59	5,15	2,75	8,94	5,40	1,91	1,95
MD06G1077500	49,24	55,31	12,05	32,20	2,54	3,32	2,46	1,68
MD06G1080900	24,01	21,99	21,22	22,12	5,73	5,18	5,90	6,17
MD06G1098700	34,27	29,33	17,48	22,26	10,07	20,59	16,30	18,82
MD06G1241300	7,38	8,94	7,79	8,28	3,54	9,22	7,67	3,30
MD07G1051600	3,09	1,80	1,38	1,24	1,22	0,72	1,66	2,63
MD07G1125500	8,93	9,04	10,80	8,87	4,33	4,21	2,38	3,47
MD07G1239900	28,19	26,64	25,57	25,60	3,28	2,07	4,18	1,99
MD07G1252700	14,83	17,65	14,62	14,02	6,00	2,78	6,67	5,50
MD08G1010300	0,74	1,52	1,51	0,87	0,86	0,82	1,68	0,62
MD08G1092600	6,64	17,60	3,95	7,15	8,38	6,41	6,25	5,93

Gén azonosító	CHG				CHH			
	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozmarying akklimatizált	Húsvéti rozmarying <i>in vitro</i>	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozmarying akklimatizált	Húsvéti rozmarying <i>in vitro</i>
MD08G1121600	12,20	11,80	8,85	12,73	4,65	2,91	5,64	5,39
MD08G1204800	62,56	55,96	25,40	18,77	8,78	4,91	5,02	3,59
MD09G1203800	26,54	27,39	17,88	18,14	5,77	6,22	8,32	5,90
MD09G1226200	7,04	6,71	5,49	9,01	4,72	2,30	2,34	2,80
MD10G1134500	49,93	55,27	87,35	88,37	5,23	3,32	8,57	7,49
MD10G1167800	0,94	1,43	2,73	4,23	0,95	1,88	1,32	0,98
MD10G1256900	31,62	31,38	29,98	31,34	5,30	4,04	4,06	4,24
MD10G1335600	1,04	0,95	0,85	2,67	1,04	1,33	0,86	1,06
MD11G1004800	24,38	32,31	10,35	22,43	4,05	4,39	6,35	5,51
MD11G1015400	7,49	13,39	3,42	4,21	0,82	1,45	1,75	0,93
MD11G1094500	48,75	50,43	49,11	52,92	12,44	12,39	13,02	10,80
MD11G1166100	11,86	13,98	11,34	12,24	5,30	4,22	4,98	3,03
MD11G1186700	31,04	30,88	25,61	26,55	5,26	10,08	7,89	8,44
MD11G1226100	72,08	74,38	30,64	16,23	11,72	7,08	2,14	3,32
MD11G1314400	10,88	11,14	8,21	10,86	2,64	1,58	1,30	1,57
MD12G1013800	6,40	6,94	4,16	4,26	2,23	1,95	1,73	0,94
MD12G1052100	16,02	14,62	11,25	14,75	2,83	3,04	3,11	2,72
MD12G1076700	7,25	8,90	6,22	5,61	7,71	7,40	5,54	8,80
MD12G1251400	27,84	30,75	24,59	34,64	2,80	3,11	3,58	3,04
MD14G1081400	52,75	56,49	43,80	45,36	11,11	11,32	11,68	12,22
MD14G1206500	4,58	5,96	3,82	2,16	3,15	2,73	2,67	3,56
MD14G1232200	2,65	2,94	2,59	2,07	1,14	0,98	0,97	1,89
MD15G1025100	22,60	21,51	8,93	16,51	7,51	4,09	7,33	7,19
MD15G1077000	2,73	11,51	1,55	5,76	1,70	2,54	3,51	2,11
MD15G1091800	NaN	NaN	NaN	NaN	45,28	40,71	36,84	11,44
MD15G1348800	13,18	15,57	13,52	23,92	9,81	7,41	4,30	8,24
MD15G1426800	16,22	17,94	36,15	30,52	1,75	2,12	2,29	2,28
MD16G1094100	NaN	NaN	NaN	NaN	10,08	4,52	13,37	9,95
MD16G1192100	22,94	22,75	20,17	23,49	8,75	7,80	9,68	10,00
MD16G1203700	7,21	8,27	22,55	27,45	1,76	1,73	3,31	3,52
MD16G1211900	66,11	71,26	47,04	59,43	10,03	10,33	12,43	10,82
MD16G1232900	49,70	46,70	78,93	47,74	4,86	2,90	3,72	3,65
MD16G1247200	35,99	38,24	15,92	19,00	2,77	1,28	1,72	2,41
MD17G1115200	90,79	90,33	9,99	9,77	17,78	14,47	2,74	1,20

Table 2/b. Table 2/b. DNA methylation levels in percentage in CHG and CHH context

3. táblázat. DNS metilációs szintek és a génextpressziós LFC értékek közötti korrelációs tényezők összehasonlítása ($r=0$ akkor a két változó között nincs lineáris kapcsolat; $r>0$ pozitív lineáris kapcsolat; $r<0$ negatív lineáris kapcsolat)

	McIntosh akklimatizált	McIntosh <i>in vitro</i>	Húsvéti rozmaring akklimatizált	Húsvéti rozmaring <i>in vitro</i>
CpG	-0,18	-0,34	-0,018	-0,17
CHG	-0,36	-0,46	-0,15	-0,36
CHH	-0,35	-0,41	-0,3	-0,38

Table 3. Comparison of correlation factors between DNA methylation levels and gene expression LFC values ($r = 0$ no linear relationship between the two variables; $r > 0$ positive linear relationship; $r < 0$ negative linear relationship)

Következtetések

Kutatási eredményeink alapján az *in vitro*, *in vivo* (anyanövény) és akklimatizált növényminták között a 17 SSR-lókuszában hosszpolimorfizmust nem tapasztaltunk, ugyanakkor elmondható, hogy a DNS-szekvencia változások és genetikai stabilitás vizsgálatokhoz további szekvencia alapú vizsgálatok bevonása szükséges, mint például a DNS-szekvenálás. Eredményeinket alátámasztják az irodalomban alkalmazott ISSR (Pathak és Dhawan, 2012) és SSR markerekkel (Jin et al., 2014; Butiuc et al., 2019) kapott genetikai stabilitási eredmények az *in vitro* növénymintákban, még több mint két évtizedes *in vitro* tenyésztést követően is. Gulyás és munkatársai (2019) által szignifikáns DNS metilációs szintű eltérések azonosítása alapján 65 gén került kiválasztásra, melyek génextpressziós változásai összességében közepes negatív lineáris korrelációban állnak a tanulmányunkban kapott LFC értékek és korrelációs tényezők alapján a CHH kontextusban lévő metilációs szinttel, mindegyik környezeti tényezőben. Ez összhangban van azzal, hogy a DNS metiláció a genom bizonyos régióiban összefügg, korrelál a génextpresszióval (Wang et al. 2015). Brenet és munkatársai (2011) CpG kontextusban alacsony negatív korrelációt tapasztaltak a gén DNS metilációs szintje és a génextpresszió között. Ezt azzal magyarázták, hogy a gén downstream található első transzkripció indító szekvenciájának (5' UTR) DNS metilációja magasabb korrelációt mutat, mint a gén vagy upstream régióké. Ezt igazolva saját tanulmányunkban a CpG kontextusban szintén gyenge negatív lineáris korrelációt figyeltünk meg, kivéve a 'McIntosh' *in vitro* növényekben, ahol közepes negatív lineáris korreláció tapasztalható. A CHG kontextus esetében a 'Húsvéti rozmaring' akklimatizált növények mutattak gyenge negatív lineáris korrelációt, míg a többi növényminta esetében közepes negatív lineáris korreláció volt megfigyelhető. Yang és munkatársai (2015) alacsony korrelációt tapasztaltak *Arabidopsis thaliana* esetében a CpG kontextus és génextpresszió között, míg a CHG és CHH kontextusokban erős pozitív korrelációt figyelt meg. Lin és munkatársai (2019) megállapították, hogy azon régiókban, ahol a legmagasabb volt a DNS metilációs szint a *Nelumbo nucifera* esetében, ott a gén expressziója lecsökkent. A gén expressziója és a DNS metiláció között negatív korrelációt mutattak ki, mely a CpG esetében alacsonyabb, míg a CHG és CHH estében magasabb volt ez az érték.

Eredményeinkkel igazoltuk azt, hogy a CpG, CHG és CHH kontextusokban a gén DNS metilációs szint változása összefüggésben áll a génexpresszió szintjével, mivel a korrelációs vizsgálataink során, ha a gén DNS metilációs szintje nőtt a különböző kontextusokban, akkor a génexpresszió csökkent, ugyanakkor, ha a gén DNS metilációs szintje csökkent, akkor a génexpressziós növekedését eredményezte. Eredményeinkből ugyanakkor arra is lehet következtetni, hogy a DNS metilációs szint és a génexpressziós intenzitás mértékének korrelációja közötti kapcsolat nem független az egyéb epigenetikai változásoktól (például a kis RNS-molekulák, hiszton-fehérjék változásai), amelyek szintén befolyásolhatják a DNS metilációját vagy a génkifejeződés mértékét.

Irodalomjegyzék

1. Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D. and Scandura, J.M. 2011. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS One*, 6(1): 14524.
2. Butiuc, A., Coste, A., Farkas, A., Cristea, V., Isac, V. and Halmagyi, A. 2019. Molecular characterization of apple (*Malus × domestica* Borkh.) genotypes originating from three complementary conservation strategies. *Turk. J. Agric. For.* 43(5): 464-477.
3. Dobránszki, J. and Teixeira da Silva, J.A. 2010. Micropropagation of apple - a review. *Biotechnol. Adv.* 28(4): 462-488.
4. Dudits, D. és Heszky, L. 2000. Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroiinform Kiadó, Budapest. 312.
5. Galli, Z., Halász, G., Kiss, E., Heszky, L. and Dobránszki, J. 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *Hort. Sci.* 40(7): 1974-1977.
6. Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J. M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., and Foster, R. 1997. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254.
7. Gulyás, A., Dobránszki, J., Kiss, E., Teixeira da Silva, J.A., Posta, K. and Hidvégi, N. 2019. Changes in DNA methylation pattern of apple long-term *in vitro* shoot culture and acclimatized plants. *J. Plant Physiol.* 239: 18-27.
8. Jin, W., Wang, Y. and Wang, H. 2014. Adventitious shoot regeneration from leaves of apple rootstock 'Pingyitiancha' (*Malus hupehensis* var. *pinyiensis*) and genetic fidelity of regenerated plantlets using SSR markers. *Can. J. Plant Sci.* 94(8): 1345-1354.
9. Karim, R., Nuruzzaman, M., Khalid, N. and Harikrishna, J.A. 2016. Importance of DNA and histone methylation in *in vitro* plant propagation for crop improvement: a review. *Ann. Appl. Biol.* 169(1): 1-16.
10. Kohpali, F.N., Farahani, F. and Noormohammadi, Z. 2017. Somaclonal variation in the *in vitro* regenerated pineapple (*Ananas comosus*): investigation of the cellular characteristics, biochemical specificities and ISSR markers. *Phytol. Balcan.* 23(1): 73-83.
11. Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Van de Weg, E. and Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breeding*, 10(4): 217-241.
12. Lin, Z., Liu, M., Damaris, R.N., Nyong'a, T.M., Cao, D., Ou, K. and Yang, P. 2019. Genome-wide DNA methylation profiling in the lotus (*Nelumbo nucifera*) flower showing its contribution to the stamen petaloid. *Plants*, 8(5): 135.
13. Modgil, M., Mahajan, K., Chakrabarti, S.K., Sharma, D.R. and Sobti, R.C. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Sci. Hort.* 104(2): 151-160.
14. Pathak, H. and Dhawan, V. 2012. ISSR assay for ascertaining genetic fidelity of micropropagated plants of apple rootstock Merton 793. *In Vitro Cell Dev-Pl.* 48(1): 137-143.

15. Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G. and Hernandez, P. 2013. Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS One*. 8:e70507.
16. Phumichai, C., Phumichai, T. and Wongkaew, A. 2015. Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) markers for genetic diversity assessment of cultivated and wild *Hevea* rubber. *Plant Mol. Biol. Report*, 33: 1486-1498.
17. Quadrana, L. and Colot, V. 2016. Plant transgenerational epigenetics. *Annu. Rev. Genet.* 50: 467-491.
18. Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L. and Munhoz, C.D.F. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* 39(3): 312-328.
19. Wang, H., Beyene, G., Zhai, J., Feng, S., Fahlgren, N., Taylor, N.J., Bart, R., Carrington, J.C., Jacobsen, S.E. and Ausin, I. 2015. CG gene body DNA methylation changes and evolution of duplicated genes in cassava. *P. Natl. A. Sci.* 112(44): 13729-13734.
20. Yang, H., Chang, F., You, C., Cui, J., Zhu, G., Wang, L., Zheng, Y., Qi, J. and Ma, H. 2015. Whole-genome DNA methylation patterns and complex associations with gene structure and expression during flower development in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 81(2): 268-281.

Genetic stability and gene expression tests in apples shoot cultures

GULYÁS, A.¹, DOBRÁNSZKI, J.¹, KISS, E.², HIDVÉGI, N.¹

¹Research Institute of Nyíregyháza, IAREF, University of Debrecen, Nyíregyháza

²Institute of Genetics, Microbiology and Biotechnology, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Szent István University

Summary

Epigenetics is a change in the expression of a gene or in the phenotype of a cell that can occur during mitosis or meiosis and does not result in DNA sequence alteration. Chemical groups can attach to DNA, which can alter the activity of the gene. The so-called “above genetics” of eukaryotes that accompany the development of individuals. epigenetic changes also occur in *in vitro* plant cultures. Epigenetic modifications regulate somatic embryogenesis and organogenesis during regeneration. However, the medium components may also be present in *in vitro* shoot cultures for micropropagation upon running conditions. In our experiments, we sought to determine whether the microsatellite (SSR) and transcriptome profile patterns of several decades *in vitro* shoot cultures are the same or different from the parent (mother plant) plants and whether any changes reverse during acclimatization. The ‘McIntosh’ and ‘Húsvéti rozmaring’ apple varieties were used as the basis for our research. The genetic identity of the mother and the plants maintained in *in vitro* shoot culture for more than 20 years was determined by microsatellite markers, and the gene expression pattern was determined by RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) in 65 selected genes levels. No DNA sequence changes were observed in our results; however, gene expression differences were found for the genes tested, which are negatively correlated with DNA methylation levels.

Keyword: apple, epigenetics, gene expression, microsatellite marker, RT-qPCR

Szerzők:

Gulyás Andrea (kapcsolattartó szerző) – tudományos segédmunkatárs, Debreceni Egyetem Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság, Nyíregyházi Kutatóintézet, 4400 Nyíregyháza, Westsik Vilmos utca 4-6.

Hidvégi Norbert – tudományos segédmunkatárs, Debreceni Egyetem Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság, Nyíregyházi Kutatóintézet, 4400 Nyíregyháza, Westsik Vilmos utca 4-6.

Dobránszki Judit – DSc, tudományos tanácsadó, Debreceni Egyetem Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság, Nyíregyházi Kutatóintézet, 4400 Nyíregyháza, Westsik Vilmos utca 4-6.

Kiss Erzsébet – CSc, professor emeritus, Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Genetika, Mikrobiológia és Biotechnológiai Intézet, 2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.