



Ledóné Dr. Darázi Hajnalka  
Főiskolai docens

## Nemesítés és fajtahasználat

### Molekuláris genetika alkalmazása a növénynemesítésben

Jelen tananyag a Szegei Tudományegyetemen készült az Európai Unió támogatásával.

Projekt azonosító: EFOP-3.4.3-16-2016-00014

**Olvasási idő 40 perc**

#### Összefoglalás

*A növényi biotechnológia dinamikusan fejlődő területe a növények genetikai programjának (géntechnológia) megváltoztatása, melynek részét képezik a molekuláris genetikai és genomikai, a molekuláris növénynemesítés, a molekuláris transzformáció (gensebészet, géntechnológia) módszerei és a transzgénikus növények, géntechnológiai stratégiák.*

#### Tartalom

- Géntechnológia alkalmazási területei
- Molekuláris markerek alkalmazása
- Molekuláris markerek, markerezési technikák csoportosítása
- A molekuláris markerek alkalmazása
- Transzgénikus növény előállítása

## Géntechnológia alkalmazási területei

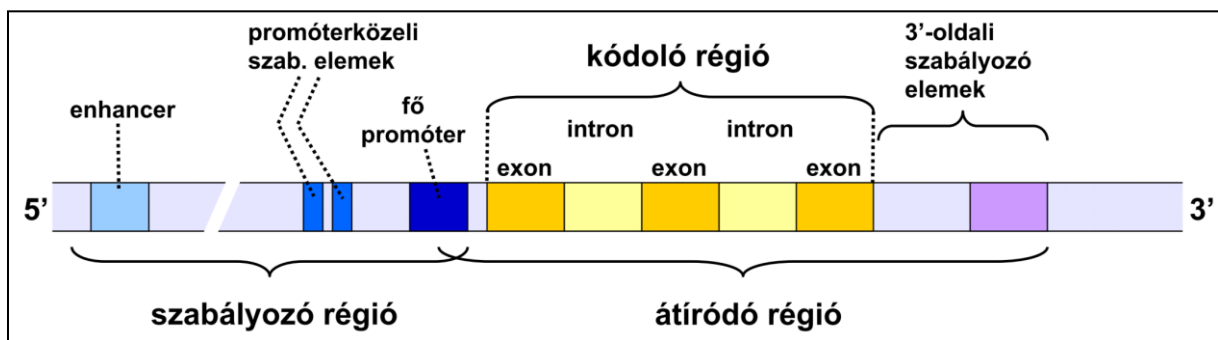
A **konvencionális növénynemesítés** a klasszikus genetikai ismeretekre alapoz, a fenotípusból indul ki és a keresztezést követő generációk tulajdonságaiból, lehet következtetni a genotípusra. A **molekuláris növénynemesítés** a molekuláris genetikára épít, a genotípusból indul ki, és annak megváltoztatásával hozza létre a kívánt fenotípust.

*A molekuláris genetika számtalan előnyt rejt magában:*

- a biotechnológiai eljárások alkalmazása során az új genotípus előállításához szükséges *időtartam lerövidíthető*,
- bizonyos *gének frekvenciája megnövelhető*,
- akár egyetlen nemzedéket követően genetikailag *homozigóta utódok állíthatók elő*,
- mennyiségi és minőségi szempontból *hatékonyabb termelésre alkalmas fajták* hozhatók létre.

A molekuláris genetika alkalmazásával a növények működését vezérlő genetikai programokat képesek vagyunk megváltoztatni a termelés szükségleteinek megfelelően.

*A klasszikus és molekuláris genetika egymástól elválaszthatatlan, egymást kiegészítik.*



1. ábra Eukarióta gén felépítése (Forrás: [http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/Gen\\_.htm](http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/Gen_.htm))

Az élőlények tulajdonságait kettős szálú DNS –molekula kódolja. Azon szakaszait, amelyek valamilyen tulajdonságot, biológiai funkciót kódolnak géneknek nevezzük. A gének közötti szakaszok nem kódoló régiók. A gének többsége fehérje kódoló- RNS- sé átíródik- transzkripció, majd fehérjévé fordítódik- transzláció. 5'→ 3' szál a kódoló szál- ennek nukleotid sorrendje megegyezik az RNS másolatával, 3'→5' minta szál, mentén készül az RNS másolat (1. ábra)

A **géntechnológia**, mint molekuláris növénynemesítési módszer a **molekuláris biológia**, **sejtgenetika** és **szövettenyésztés** különböző módszereit alkalmazza, melyek lehetővé teszik:

- a) az egyes tulajdonságokért felelős **gének izolálását, jellemzését és felszaporítását** (klónozását);
- b) a gazdaságilag jelentős **gén** olyan **vektorba építését**, mellyel lehetővé válhat a gén átvitele a recipiens sejtbe, biztosítja továbbá a genomba való integrációját és működését;

- c) a **genetikailag módosított sejtekből** a kifejlett **szervezet** (transzgénikus növény) **előállítását** (regenerációját).

### A génazonosítás főbb céljai

- A fenotípus kialakításában szerepet játszó *genetikai komponensek, szabályozó mechanizmusok, biokémiai folyamatok tisztázása*
- *Diagnosztikai* markerek, módszerek kidolgozása
- *Variabilitás tesztelése* vad és termesztett fajtákon belül, illetve a rokon fajok csoportjában
- *Gének, allélek beépítése* nemesítési alapanyagokba
  - marker szelekcióval egybekötött hagyományos keresztezésekkel
  - genetikai transzformációval

### Molekuláris markerek alkalmazása

#### Genetikai marker

- a növény teljesítményét közvetlenül nem meghatározó, jól jellemezhető bélyeg,
- előfordulása kapcsolatba hozható egy, a produkció szempontjából fontos, de nehezen kimutatható tulajdonsággal, a DNS- vagy fehérje-szekvenciákban mutatózó variabilitás alapján alkalmas a növényegyed fenotípusos és/vagy genotípusos jellemzésére

A genetikai markerként szolgáló allélok kimutatása történhet

- az általuk meghatározott fenotípusos tulajdonság (**morfológiai markerek**) – pl. magszín,
- a géntermék fehérje (**biokémiai markerek**) – pl. izoenzimek,
- maga a DNS-szekvencia (**molekuláris markerek**) alapján.

#### Morfológiai markerek



2. ábra *Paradicsom -Burgonya levél-hímsterilitás* ('burgonyalevél' -A; normál levél -B)

- Könnyen azonosíthatók
- Fiatal növényenél is- szikleveles állapotban

- Egy kromoszómán öröklődik a jelzett tulajdonsággal, kapcsolt öröklődés,
- Szoros kapcsoltság esetén a két tulajdonság nagy arányban együtt jelenik meg. (2. ábra)

**A molekuláris markerek – olyan DNS szakaszok, amelyek alkalmasak fajok, populációk, fajták és egyedek megkülönböztetésére és azonosítására.**

Gyakran a *DNS nem kódoló részében* vannak. Morfológiai és biokémiai markerekkel szembeni *előnyei*:

- *függetlenek a környezeti hatásoktól*, az egyed korától (minden organizmus azonos DNS állománnyal rendelkezik),
- *számuk elméletileg korlátlan*,
- mivel magára a DNS molekulára épülnek, *a variabilitás objektív meghatározását teszik lehetővé.*

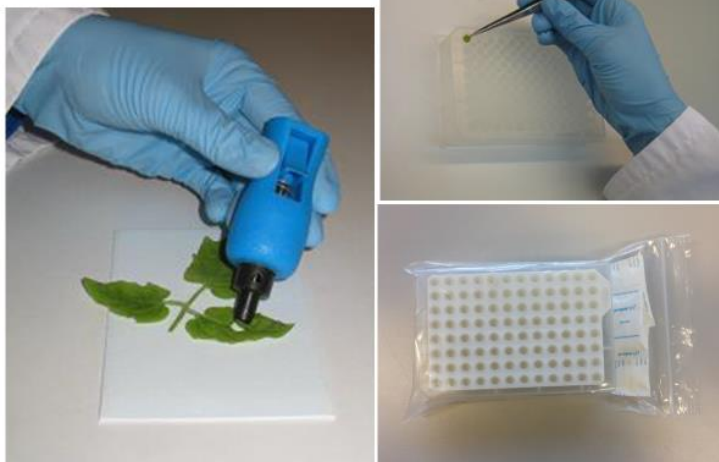
**A molekuláris marker használatának előnye:**

- új genotípus előállításához szükséges *időtartam lerövidíthető*,
- bizonyos *gének frekvenciája megnövelhető*,
- akár egyetlen nemzedéket követően *genetikailag homozigóta utódok állíthatók elő.*

**Az ideális marker tulajdonságai**

- Polimorfizmus (sokféle)
- Kodomináns öröklődésű (diploidoknál a homo-és heterozigóta állapot elkülöníthető)
- Genomban gyakran előfordul és egyenletesen
- Stabil (bármely szövetből és fejlődési stádiumban)
- Könnyen vizsgálható, megismételhető, eredmények összevethetők,
- Kis mennyiségű minta elegendő,
- A vizsgálat és a marker fejlesztés nem túl költséges.

Mintavétel molekuláris teszthez



3. ábra

A molekuláris markerek vizsgálatához fiatal levélmintát alkalmaznak, kb 1 cm<sup>2</sup> nagyságban. A mintákat tálcákba helyezik (plate), ahol minden mintát koordináta jellemez, a mintákat csomagolják, szállítják vagy fagyasztva tárolják a felhasználásig. (3. ábra)



## **Molekuláris markerek, markerezési technikák csoportosítása**

### **Technika alapján**

- nukleinsav hasításán alapuló (RFLP)
- nukleinsav-szakasz felszaporításán (PCR) alapuló módszerek

### **Felhasználhatóságot meghatározó információ-tartalom alapján**

- domináns (RAPD, AFLP, stb.)
- kodomináns (RFLP, SSR, AFLP, stb.) /a heterozigót és homozigóta alléleket megkülönbözteti/

**RFLP** (*Restriction Fragment Polimorphism*) –resztrikciós fragmentumhossz-polimorfizmus.

A resztrikciós endonukleázok alkalmazásán alapul, indirekt módon. Első DNS markerezési eljárás, 1980-ban alkalmazták először. Előnye, hogy nem igényel előzetes szekvencia ismeretet, *kodomináns*. Hátránya nagy mennyiségű DNS-t igényel, hosszadalmas, költséges. Alkalmos allélpolimorfizmus kimutatásra, fajta azonosításra, térképezésre.

**PCR** (*Polimerase Chain Reaction*) - polimeráz láncreakció

A módszer kidolgozásáért **Mullis, K. kémiai Nobel-díjat kapott 1993-ban**. A DNS enzimatisz amplifikálására (kópiák megsokszorozására) alkalmas molekuláris biológiai technológia. A PCR lehetővé teszi a DNS egy rövid, jól definiált szakaszának megsokszorozását analízis céljából. *PCR-rel 50 bp-10 kbp méretű DNS(RNS)-fragmenteket lehet felszaporítani*. (A módszert megkönnyítette, hogy a Yellowstone Nemzeti Park hőforrásaiban egy baktérium fajt találtak (*Thermus aquaticus*), amelyből hőstabil DNS-polimerázt izoláltak.)

### **PCR- technika alkalmazása a növényi molekuláris genetika területén**

- Gének izolálása, klónozása, génexpresszió összehasonlítása, genetikai térképezés,
- DNS –ujjlenyomat készítése, rokonsági kapcsolatok vizsgálata, fajtaazonosítás,
- Adott gén (tulajdonság) nyomkövetése;
  - Mutációk kimutatása
  - Bakteriális, virális fertőzés ellenőrzése,
  - Ivar meghatározás,
  - Transzgénikus növények ellenőrzése.

### **Mikroszatellit polimorfizmus**

**Mikroszatellit** (*simple sequence repeats, SSRs* vagy *short tandem repeats, STRs*) kis méretű (2-5 bp), nagy polimorfizmust mutató, ismétlődő szekvenciák, amelyek a működő géneken kívüli, nem-kódoló DNS szakaszokon helyezkednek el.

Egyedre jellemző, meghatározott számú és meghatározott ismétlődésű bázispárból állnak: egy, kettő, három vagy négy bázispár (mono-, di-, tri-, vagy tetra-nucleotid repeat), 5-30-szoros ismétlődés jellemzi, *kodomináns*.

**SNP** (*single nucleotid polimorphism*) Egyetlen nukleotid bázis pár gyakoriságát vizsgálja a genomban, a *legegyszerűbb molekuláris marker*, mivel az öröklődés legkisebb egysége a bázispár. Gyakoriak a növény és állatfajokban, előfordulhatnak a gén kódoló szakaszában vagy azon kívül. Egy SNP marker 100-300 bázispáronként előfordul a növények esetében. (4. ábra)

## A molekuláris markerek alkalmazása

### Genetikai polimorfizmus vizsgálata

**Genomszintű molekuláris variabilitás**, egyed, fajta, faj, nemzetség stb. **jellemzése**, azonosítása a nukleotidok változatos, genotípusra jellemző előfordulása (polimorfizmus) alapján; genetikai vagy DNS ujjlenyomat (fingerprint).

### Gyakorlati alkalmazásuk:

- **Hibrid mag tisztaság** vizsgálata- szülők FP (finger print) eredménye alapján a hibrid mag % meghatározása.
- Vonalak **allél homogenitásának** vizsgálata. (4. ábra)
- **Genetikai források** (hibrid populációk) gén gyakoriságának összehasonlítása.
- **Géntérképezés** Adott genotípus kapcsoltsági géntérképe, gének izolálása, átvitele más genotípusokba (transzformáció); homológ szekvenciák alapján egy gén helyének beazonosítása a géntérképen.

**Markeren alapuló szelekció** (*marker assisted selection, MAS*) fontos tulajdonságok azonosítása, szelekciója olyankor, amikor azok fenotípusos azonosítása nehézségekbe ütközik, (pl. recesszív öröklődésű vagy alacsony  $h^2$ -értékű), fontos tulajdonságok szelekciója a **cél-lokusszal szorosan kapcsoltnan öröklődő molekuláris markerek** alapján. Előnyei:

- a szelekció már **csíranövény korban** lehetséges
- a homo- és heterozigóták megkülönböztethetők csak a **kodomináns markereknél!**
- **rezisztencia gének piramidálása** lehetséges (5., 6., 7 ábra)
- **poligénes öröklődésű** mennyiségi tulajdonságokat meghatározó **génhelyek** (*quantitative trait loci, QTL*) azonosítása.

**SNP markerek alkalmazása a gyakorlati nemesítésben, egyedek homogenitás vizsgálata**

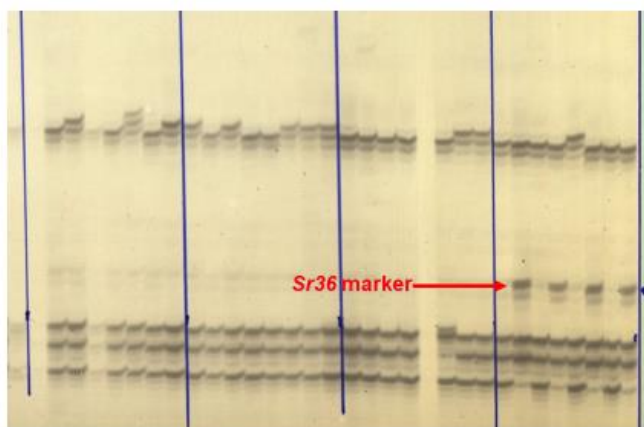
Customer test request:		SNP
Inbake (VV + HP) 96 seeds, 16 SNPs		<input type="checkbox"/>
Hybrid purity (HP)		<input type="checkbox"/>
Variety verification (VV)/ Grouping 16 SNPs		<input checked="" type="checkbox"/>
Variety verification (VV)/ Grouping 48 SNPs		<input type="checkbox"/>
Variety verification combination		<input type="checkbox"/>

Variety	Lot/Batch number	Location	IND. 01 PEF	IND. 02 PEF	IND. 03 PEF	IND. 04 PEF	IND. 05 PEF	IND. 06 PEF	IND. 07 PEF	IND. 08 PEF	IND. 09 PEF	IND. 10 PEF	IND. 11 PEF	IND. 12 PEF	IND. 13 PEF	IND. 14 PEF	IND. 15 PEF	IND. 16 PEF	IND. 17 PEF
6ASP502	Plant 2	A-1	B	A	A	B	A	B	B	A	A	B	A	B	A	B	B	A	B
6ASP502	Plant 5	A-2	B	A	A	B	A	B	B	A	A	B	A	B	A	B	B	A	B
6ASP502	Plant 4	A-3	B	A	A	B	A	B	B	A	A	B	A	B	A	B	B	A	B
6ASP504	Plant 1	A-4	A	A	A	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B
6ASP504	Plant 3	A-5	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A	B	A	B	A	A	A	B
6ASP504	Plant 4	A-6	A	A	A	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B
6ASP504	Plant 5	A-7	A	A	A	B	B	A	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	B
6ASP516	Plant 1	A-8	B	A	A	B	B	B	B	A	A	B	A	B	A	B	B	B	B
6ASP516	Plant 2	A-9	B	A	A	B	B	B	B	A	A	B	A	B	B	B	B	B	B
6ASP516	Plant 3	A-10	B	A	H	B	B	B	B	A	A	B	A	B	B	B	B	B	B
6ASP516	Plant 4	A-11	B	A	H	B	B	B	B	A	A	B	A	B	B	B	B	B	B
6ASP516	Plant 7	A-12	B	A	H	B	B	B	B	?	B	A	A	B	A	B	B	B	B

4. ábra 16 SNP marker alkalmazása öntermékenyített paprika vonalak homogenitásának ellenőrzésére. 'A' és 'B' a marker homozigóta állapotát, 'H' hereozigóta állapotát jelzi. 502, 504 vonal marker mintázata az egyedek között azonos, míg 516 vonalnál eltérő. (saját szerkesztés)

**Az Sr36 szároztsda rezisztenciagén azonosítása szegedi búzafajtákban a rezisztencia-génnel kapcsolt mikroszatellit (gwm271) markerral**

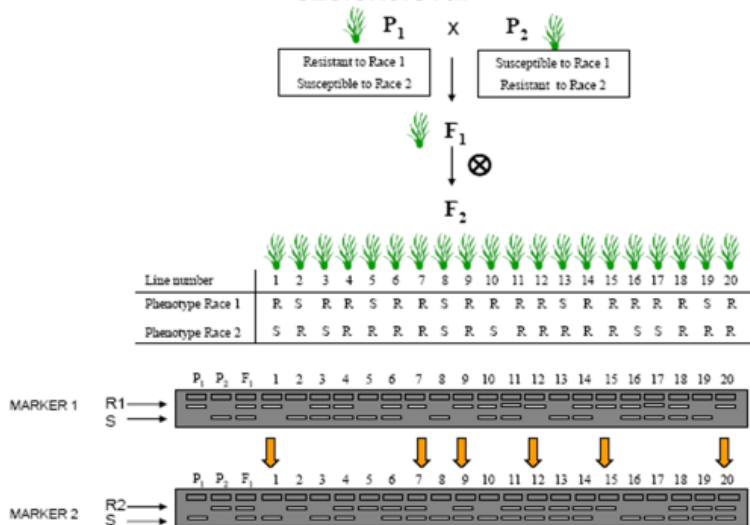


- |                      |                        |                 |
|----------------------|------------------------|-----------------|
| 1.) GK Délibáb       | 5.) GK Hattyú          | 1 2 3 4 5 6 7 8 |
| 2.) GK Zugoly (Sr36) | 6.) GK Holló (Sr36)    |                 |
| 3.) GK Verecke       | 7.) GK Véka            |                 |
| 4.) GK Tündér (Sr36) | 8.) GK Csongrád (Sr36) |                 |

Purnhauser és mtsai nyomán

5. ábra

**Két rezisztenciagén piramidálása markeren alapuló szelekcióval**



[http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Marker\\_assisted\\_breeding.htm](http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Marker_assisted_breeding.htm)

6. ábra



7. ábra Öt rezisztencia gén azonosítása paradicsom vonalakban, molekuláris markerekkel (saját szerkesztés)

### Transzgénikus növény előállítása

**Az EU (2001/18/EG)** és a **géntechnológiai tevékenységről szóló törvény (XVII./1998.)** szerint a **genetikailag módosított szervezetek (GMO)** olyan élő szervezetek, amelyekben a genetikai örökítőanyagot (DNS) olyan módon változtatták meg, ami a természetben nem fordul elő a kereszteződés és a természetes rekombináció során.

**Az első genetikailag módosított (GM) növények** a köztermesztésben:

1994 - GM 'Flavr Savr' paradicsom, puhulás gátlása (termesztésben 1997-ig)

1995 - GM *Bt* kukorica, rovarrezisztencia

1996 - GM 'Roundup Ready' szója, herbicid (glifozát)-tolerancia

A különböző **gazdasági célok alapján** való csoportosításnál hagyományosnak mondható a **GM növények generációkba sorolása**.

Az **első generációs transzgénikus növények** esetében a stratégia a **mezőgazdasági termelés, az agrotechnika segítése** volt:

- a biotikus (vírus, gomba, baktérium, rovar) rezisztencia,
- az abiotikus (herbicid) rezisztencia kialakítása

Napjainkig a rovarrezisztens és herbicidrezisztens növényeket termesztik a legnagyobb területen a világon. Különösen **sikeresek** tekinthetők a GM fajták **gyapot, szója, repce és kukorica fajok esetében**. A **zöld és környezetvédő mozgalmak** ellenállása és aktivitása **miatt**, az első generációs transzgénikus növényfajták **elterjedése** a világon azonban sok **akadályba ütközött és ütközik**.

A **második generációs transzgénikus növények** esetében a stratégiát **speciális minőség előállítása** jelenti, főleg a fogyasztói és élelmiszeripari igények jobb kielégítése céljából. A konkrét genetikai módosítások **célja a növények anyagcseréjének, növekedésének és fejlődésének módosítása**. Sikeres második



generációs GM fajták paradicsom, repce és burgonya esetében már köztermesztésbe kerültek.

A **harmadik generációs transzgenikus növények** esetében a cél olyan GM növények előállítása, melyeket, mint **bioreaktorokat** lehet felhasználni **speciális molekulák előállítására**, főleg a **gyógyszeripar, műanyagipar, takarmányipar számára**. Ide tartoznak azok a transzgenikus növények is, melyekben **a transzgen expressziója specifikus promoterekkel szabályozott**. Tehát a gén a növény életének meghatározott szakaszában és a növény megfelelő szervében vagy szövetében működik, illetve működése kémiai az ember által bármikor kiváltható. (8. ábra)

### A transzgenikus növényekkel kapcsolatos rizikófaktorok /részletes anyag, Monostori- Csiba, 2019. 80-84. oldal/

#### **Biológiai (ökológiai) rizikófaktorok**

##### *A transzgen hatása*

- Antibiotikum-rezisztencia kialakulása
- A transzgen megszökése pollennel, maggal, vegetatív részekkel
- Új vírustörzsek megjelenése

##### *A géntermék (fehérje) hatása*

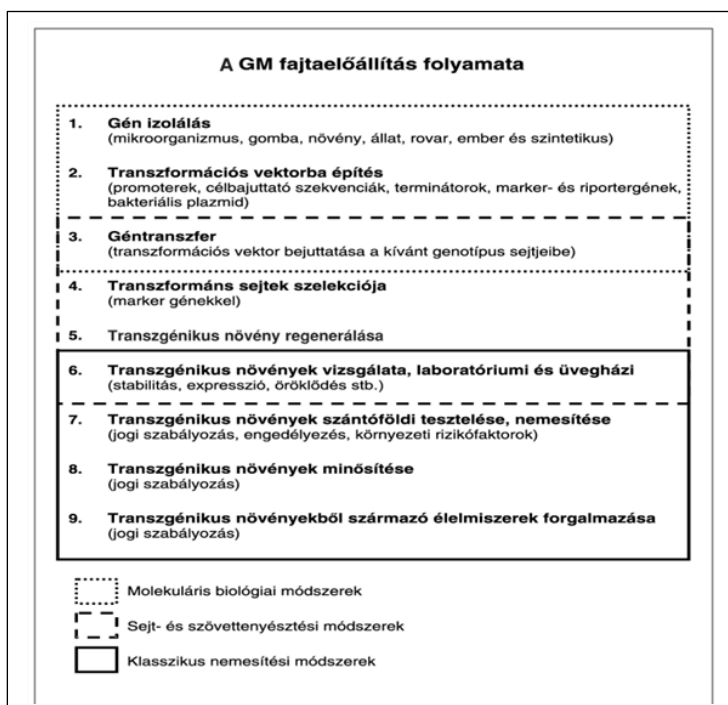
- Környezeti hatások: a környezet növény és állatvilágára gyakorolt hatás, rezisztens gyomok, kórokozók, kártevők megjelenése
- - Élelmiszerként kifejtett hatások: toxicitás, allergén hatás

#### **Gazdasági (szociális) rizikófaktorok**

##### *Genetikai gyarmatosítás és globalizáció*

*Nem célzott gazdasági hatások (pld. Piacvesztést eredményez)*

*A GM növények termesztői, a hagyományos (kemikáliákat is alkalmazó), illetve az ökológiai szemléletű (vegyszermentes) gazdálkodást folytatók érdekeinek ütközése, illetve azok egyeztetése (koegzisztencia) hosszan tartó konfliktusok forrása lehet, mi törvényi szabályozással kezelhető.*



8. ábra A transzgenikus (GM) növényfajta előállításának főbb lépései és módszerei a gén izolálástól a köztermesztésbe kerülésig [1]



## A növényi géntechnológia új lehetőségei

A GM növényekkel kapcsolatos biológiai **rizikófaktorok technológiai alapjai** jelentős mértékben **kiküszöbölhetőek** lehetnek az új növénynevelési módszerekkel.

Napjainkra a genetikai transzformáció alternatívájaként fokozott figyelem irányul a **genomszerkesztésre** ('*genome engineering*'), ami általában **nem igényli idegen gén bevitelét**, így az ilyen típusú módosítással létrehozott szervezetek GMO-ként tárgyalása már a törvényi szabályozás szintjén is kérdésessé vált. Viszonylagos egyszerűsége, sokoldalúsága (és kisebb költségei) miatt **legperspektivikusabbnak** a **CRISPR/Cas9 rendszer** (CRISPR – halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések) látszik, de ide tartozik a **TALEN-ek** (transzkripció aktivátor-szerű effektor nukleázok) alkalmazása. **Speciális területet** jelentenek a **ciszgénikus növények**, melyekbe saját fajú vagy vele keresztezhető donor növényből származó gén(ek)et ültettek be géntechnológiai módszerekkel. A gén(ek) általában az intronokat és a természetes promóter- és terminátor régiókat is tartalmazzák. E növények esetében teljes mértékben megvalósul a **genetikai transzformáció azon előnye**, hogy a hagyományos keresztezéssel szemben, itt **csak a fontos tulajdonságot kódoló gén(ek) átvitele valósul meg**. Napjainkig a **legtöbb ciszgénikus növényt burgonyában állították elő**, különböző *Solanum* fajokból *Phytophthora infestans* elleni rezisztenciagének bevitelével.

A napjainkban köztermesztésben lévő **GM növények** többségének előállítását során szelekciós markergének stabil beépítésére is sor került. Ezek mikrobiális eredete, illetve a kifejeződésük által megjelenő tulajdonság (pl. antibiotikum-rezisztencia) folyamatosan alapot szolgáltat a GMO-k kritikussai számára. Fokozott figyelmet érdemelnek, tehát azok a módszerek, melyek **markermentes szelekciót**, a markerek és egyéb idegen szekvenciák eltávolítását teszik lehetővé.

### Ajánlott olvasmányok

1. [Precíziós gén- és genomszerkesztés az élhetőbb világért – a Magyar Tudományos Akadémia állásfoglalása](#)
2. [Az agrárium érdekei kikényszerítik az új nemesítési eljárások elfogadását](#)
3. Monostori T.- Csiba A. (2018): Mezőgazdasági biotechnológia. [http://eta.bibl.u-szeged.hu/656/1/EFOP\\_34316201600014\\_jegyzet\\_Monostori\\_Mg\\_Biotech\\_2019040\\_5.pdf](http://eta.bibl.u-szeged.hu/656/1/EFOP_34316201600014_jegyzet_Monostori_Mg_Biotech_2019040_5.pdf)

### Források

1. Dudits Dénes-Heszky László: Növényi biotechnológia és géntechnológia [https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011\\_0001\\_533\\_NovenyiBiotechnologia/ch02.html](https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_533_NovenyiBiotechnologia/ch02.html)
2. Monostori T.- Csiba A. (2018): Mezőgazdasági biotechnológia. [http://eta.bibl.u-szeged.hu/656/1/EFOP\\_34316201600014\\_jegyzet\\_Monostori\\_Mg\\_Biotech\\_2019040\\_5.pdf](http://eta.bibl.u-szeged.hu/656/1/EFOP_34316201600014_jegyzet_Monostori_Mg_Biotech_2019040_5.pdf)
3. Pepó Pál (2011): Növénynevelés. DE, NyME, PE. [http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010\\_1A\\_Prez\\_07-Novenynemesites/adatok.html](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Prez_07-Novenynemesites/adatok.html)

### Ellenőrző kérdések

1. Foglalja össze a molekuláris markerek alkalmazásának jelentőségét a növénynevelésben!
2. Véleménye szerint a transzgénikus növényfajtákkal kapcsolatos ellenőrzés a társadalomban mennyire bizonyítható tudományos tényekkel?