



SZENT ISTVÁN EGYETEM
KERTÉSZETTUDOMÁNYI KAR
GENETIKA ÉS NÖVÉNYNEMESÍTÉS TANSZÉK

**A csonthéjas gyümölcsök egyes gazdasági értékeit
meghatározó transzkripciós faktorok vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

BALOGH ESZTER

Budapest

2019

A doktori iskola

megnevezése: **Kertészettudományi Doktori Iskola**

tudományága: **Kertészeti biológia**

vezetője: **Zámboriné Dr. Németh Éva**
egyetemi tanár, DSc
SZIE, Kertészettudományi Kar,
Gyógy- és Aromanövények Tanszék

Témavezető: **Dr. Hegedűs Attila**
egyetemi tanár, DSc
SZIE, Kertészettudományi Kar,
Genetika és Növénynevelés Tanszék

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhely vitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

Zámboriné Dr. Németh Éva
Iskolavezető

Dr. Hegedűs Attila
Témavezető

1. BEVEZETÉS

A hazai csonthéjas gyümölcs-termesztés számára az elmúlt pár évtizedben kritikus tényezővé vált a téli–koratavaszi időszakban tapasztalható szélsőséges hőmérsékletingadozás (Pedryc és mts., 1999; Szalay és mts. 1999). A mérsékelt égövi fafajok, így gyümölcstermő növényeink életciklusa is aktív- és nyugalmi periódusra osztható (Hanninen és Tanino, 2011). A mélynyugalmi állapot genetikailag rögzített tulajdonság, melynek segítségével a növény átvészeli a növekedés és fejlődés szempontjából kedvezőtlen időszakot. A mélynyugalom bizonyos mennyiségű hideghatásra ér véget, az ezt követő kényszernyugalmi időszakban a fejlődési folyamatok megindulását a külső környezeti hatások szabályozzák (Rohde és Bhalerao, 2007; Hanninen és Tanino, 2011).

Ma már számos fás növény, köztük több *Rosaceae* családba tartozó faj esetében azonosítottak olyan géneket, melyek fagyűrés és a nyugalmi állapot szabályozásában vesznek részt (Bielenberg et al., 2008; Yamane és mts., 2011; Wisniewski és mts., 2011; Zhang és mts. 2013) . Ezen gének jó része transzkripciós faktorokat kódol, melyek szerepe az egyes gének promóter régiójához kötődve azok aktiválása (Weaver és Hedrick, 1997).

A CBF transzkripciós faktorok az AP2/ERF család DREB1 alcsaládjába tartozó fehérjék (Reichmann és Meyerowitz, 1998). *Arabidopsis* növényen végzett kísérletekkel igazolták, hogy a CBF- kódoló gének alacsony hőmérsékleten igen gyorsan indukálódnak, és aktiválják azokat a *COR* (*cold-regulated*) géneket, nagymértékben hozzájárulnak az alacsony hőmérsékleti stressztűrés, illetve a fagyűrés kialakításához (Stockinger és mts., 1997). A *Prunus* nemzetségen belül is számos fajban, köztük őszibarackban (Wisniewski és mts., 2011) és japán kajsziban (Zhang és mts. 2013) azonosítottak CBF transzkripciós faktort kódoló géneket.

Mérsékeltövi fás növények esetében a téli rügynyugalmi állapot szabályozását a MADS-box –fehérje család speciális csoportja, az ún. DAM (Dormancy Associated MADS-box) transzkripciós faktorok végzik, melyeket *Prunus* fajok közül először őszibarackban azonosítottak (Bielenberg és mts. 2008). Li és mts. (2009) expressziós vizsgálatokkal bizonyították, hogy a hat DAM gén kifejeződésének helye eltérő, expressziós szintjük pedig a vegetációs időszak során változik, ami összefüggésben lehet a fotoperiódus változásával. Yamane és mts. (2011) őszibarackon és japán kajszin végzett kísérletei alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a DAM5 és DAM6 gének rügynyugalom kialakításában játszott szerepét. Munkánk egyik célja CBF-, és DAM5-6 szekvencia-homológok azonosítása volt kajsziból (*P. armeniaca*), mivel erről a fajról még nem állt rendelkezésre hasonló adat, miközben gazdaságilag igen jelentős gyümölcsfaj, és termesztésének északi határán, a hűvösebb klímájú termőterületeken a korai virágzás komoly veszteséget okozhat a termesztőknek.

A hazai nemesítőknek a termesztési szempontok mellett a fogyasztói igények folyamatos változásához is igazodniuk kell, melyben egyre nagyobb hangsúlyt kap az érési időszak kibővítése. A gyümölcsfák nemesítésének egyik legfőbb problémája a hosszú vegetatív időszak, mely csonthéjasoknál fajtól függően 3-5 év is lehet. A keresztezésekből származó utódpopulációk vizsgálata és értékelése emellett meglehetősen hely- és költségigényes folyamat, ami molekuláris markerezési eljárásokkal hatékonyan csökkenthető, mivel már csíranövény korban szelektálhatjuk a kívánt genotípusokat.

Az érési idő mennyiségi tulajdonság, vagyis poligénes öröklődést mutat. Az ilyen jellegű tulajdonságok kialakítását több ún. QTL (quantitative trait locus) szabályozza, melyek sokszor eltérő kromoszómákon helyezkednek el. Őszibarack esetében az érési időt meghatározó fő QTL a G4-es kapcsoltsági csoporton elhelyezkedő qMD4.1 lókuszt (Dirlewanger és mts. 2004). Ebben a lókusztban egy olyan szekvenciát azonosítottak, mely egy NAC transzkripciós faktort kódol (Eduardo és mts., 2011). A vizsgált *Prunus persica* NAC1 gén

szekvenálása során egy 9 bázispárnyi in-frame inszerciót fedeztek föl, melynek következménye a C-terminális régióban található három aminosav tandem duplikációja. Az allél együtt öröklődött a korai érésidővel a kísérletben vizsgált F2 populációkban: a korai érésű egyedek az inszerciót tartalmazó allélt hordozták, a kései érésűek pedig a 'Lovell' referenciagenomban megtalálható allélt (Pirona és mts. 2013). A három aminosav duplikációjával járó szerkezetmódosulás feltehetően hatással van a fehérje funkciójára is, ám ennek feltérképezéséhez további vizsgálatok szükségesek. A *PpNAC1* gén allélvariációi azonban jó eséllyel használhatók funkcionális markerként nemesítési programokban, érési időre történő szelekcióhoz. Munkánk során ezt a *PpNAC1* genotípus és az érési idő között feltételezett összefüggést kívántuk bizonyítani egy szélesebb, érési idő tekintetében változatos őszibarack fajtakörön.

2. CÉLKITŰZÉS

1. A kajszi (*Prunus armeniaca* L.) nyugalmi idejének hosszát, illetve virágzásidejét meghatározó C-repeat binding factor (CBF) transzkripciós faktort kódoló gén azonosítása és szerkezeti jellemzése, mivel ennél a gyümölcsfajnál még nem állt rendelkezésre ilyen szekvencia adat.
2. A kajszi (*Prunus armeniaca* L.) nyugalmi idejének hosszát, illetve virágzásidejét meghatározó dormancy associated MADS-box (DAM) transzkripciós faktort kódoló gén azonosítása és szerkezeti jellemzése, mivel ennél a gyümölcsfajnál még nem állt rendelkezésre ilyen szekvencia adat.
3. Az újonnan azonosított *CBF*- és *DAM* gének expressziós vizsgálata két korai és két kései virágzású kajszifajta virágrügyeiben, két évjáratot összehasonlítva.
4. A kísérlethez kiválasztott kajszifajták nyugalmi állapotának nyomon követése a fajták hidegigényének meghatározásával és a pollenfejlődés (mikrosporogenezis) folyamatának megfigyelésével, valamint e vizsgálatok eredményeinek összevetése a génexpressziós vizsgálatokkal.
5. Az őszibarackban (*Prunus persica* L.) azonosított NAM, ATAF1,2, CUC21 (NAC1) transzkripciós faktort kódoló gén allélvariánsainak detektálása különböző érési idejű őszibarackfajtákban, valamint az allélváltozatok markerként való alkalmazhatóságának tesztelése statisztikai vizsgálattal az érési idő és a genotípus közötti korreláció alapján.
6. A *PpNAC1* génnel nagyfokú hasonlóságot mutató szekvenciák azonosítása rokon *Prunus* fajokban, valamint az őszibarack *PpNAC1*-hez hasonló allélvariációk, szekvenciabeli eltérések keresése.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Felhasznált növényanyag

Az őszibarack és a rokon fajok esetében a genomi DNS-minták izolálása vegetatív rügyekből történt, melyeket 2015 novembere és 2016 februárja között gyűjtöttünk be több helyszínről. Az RNS-izoláláshoz és a qPCR vizsgálatokhoz a SZIE Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelés Tanszék Soroksáron található kajszi génbankjából választottuk ki a korai virágzású ‘Aurora’ és ‘Goldrich’ fajtákat és a kései virágzású, jobb fagyűrűréssel rendelkező ‘Stella’ és ‘Zard’ fajtákat. Minden fajtából 3-3 fát választottunk ki, melyek egyéves vesszőiről november és március között több időpontban virágrügyeket gyűjtöttünk két, egymást követő évjáratban.

3.2. DNS alapú vizsgálatok

A genomi DNS izolálása az őszibarack, a kajszi és a vizsgálatba bevont rokon fajok esetében is vegetatív rügyekből történt a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával. A célszekvenciák amplifikálása PCR módszerrel történt, a szakirodalomból származó, rokon fajokra tervezett specifikus primerek használatával (Bielenberg és mts., 2008; Wisniewski és mts., 2011; Yamane és mts., 2011; Barros és mts., 2012; Pirona és mts., 2013). A PCR termékeket pTZ57R/T plazmid vektorba klónoztuk (Thermo Scientific) és szekvenáltattuk (ABI 3500 XL Genetic Analyzer, Baygen Intézet, Szeged). A *Prunus NAC*- szekvenciák fragmentumhossz-analíziséhez fluoreszcens festékkel jelölt forward primert használtunk (NAC-indelF, 526-FAM). A fragmentum-méret detektálása ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) használatával történt (Biomi Kft., Gödöllő).

3.3. RNS izolálás és génexpressziós vizsgálatok

Kajszi virágrügyekből az összes RNS izolálását kb. 100 mg növényi szövetből kiindulva hajtottuk végre, a Jaakola és mts. (2001) által leírt módszert alkalmazva. A DN-áz I kezelés és reverz-transzkripció után kapott cDNS mintákkal génexpressziós vizsgálatokat végeztünk real-time PCR-rel (Bio-Rad CFX96 Touch real-time PCR készülék, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A reakcióhoz az újonnan meghatározott *ParCBF1*, *ParDAM5* és *ParDAM6* szekvenciákra tervezett specifikus primereket használtunk, referencia génnek az aktint választottuk.

3.4. Bioinformatikai- és statisztikai módszerek

A *Prunus NAC*, *CBF*- és *DAM5-6* DNS-szekvenciák homológia-vizsgálatához az NCBI BLAST szoftverét (Altschul és mts., 1990), valamint a MegaBLAST algoritmust használtuk (Morgulis és mts., 2008). A szekvenciák illesztéséhez a MEGA6 (Tamura és mts., 2013) programot, az illesztések grafikai bemutatásához és a százalékos szekvencia-egyezés értékének meghatározásához pedig a BioEdit 7.2.0. programot (Hall, 1999) alkalmaztuk. A *CBF*- és *DAM* transzkripciós faktorok jellegzetes fehérje-motívumainak térszerkezeti modellezéséhez a SWISS-MODEL-t használtuk (Arnold és mts., 2006). A filogenetikai vizsgálatokat a legnagyobb valószínűség (Maximum Likelihood) módszerén alapulva a MEGA5.1 (Tamura és mts., 2011) program segítségével végeztük el. A *Prunus NAC* szekvenciák fragmentum-hossz analíziséhez az ABI Peak Scanner 1.0 programot használtuk. A *NAC*-genotípus és az érési idő közötti szignifikáns kapcsolatot Cramér-féle V-teszttel igazoltuk.

A génexpresszió relatív szintjét meghatározó, ún. fold change” értékeket a $\Delta\Delta Ct$ módszerrel számítottuk ki (Bookout és Mangelsdorf, 2003) és három biológiai párhuzamos átlagként fejeztük ki. A szignifikáns különbségek meghatározására normalitás vizsgálatot követően egytényezős ANOVA vizsgálatot és Duncan-féle tesztet végeztünk ($P < 0,05$).

3.5. A vizgálathoz kiválasztott kajszifajták hidegigényének meghatározása és mikrosporogenezis vizsgálata

Az 'Aurora', 'Goldrich', 'Stella' és 'Zard' hidegigényét az Utah modell (Richardson, 1974) és a dinamikus modell (Fishman és mts., 1987) felhasználásával határoztuk meg. A hideghatás felhalmozódásának kezdetét attól az időponttól számítjuk, amikor a hidegegységek felhalmozódását mutató adatok pozitív előjelűvé válnak, vagyis a hőmérséklet tartósan 12,5 °C alá esik. A mélynyugalom megtörésének idejét kajszi gallyak mesterséges virágoztatásával határoztuk meg (kb. 100 rügy/ág) Ruiz és mts. (2007) módszere alapján. A virágzás időpontjának azt az állapotot tekintettük, amikor a rügyek 50%-ából virág fejlődött.

A génexpressziós vizsgálatokhoz való mintagyűjtéssel egy időben a mikrosporogenezis tanulmányozásához is gyűjtöttünk virágrügyeket (fajtánként 8–10 rügy). Ezekből portokpreparátumokat készítettünk 2%-os kármin-ecetsav oldattal és Zeiss Axio Imager A2 típusú fénymikroszkóp (Carl Zeiss, Thornwood, New York, USA) alatt figyeltük meg a pollenfejlődés egyes szakaszait, melyeket Zeiss Axio Cam digitális kamerával dokumentáltuk 400× nagyításon. Mindkét évben négy fejlődési állapotot tudunk elkülöníteni: archesporium (differenciálatlan szövetállomány); meiózis előtti szakasz (a pollenanyasejtek kialakulása és elkülönülése); a meiózist követő négy utódsejtes tetrad állapot és a mikrospórák, illetve a fejlődő pollenszemek.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *P. armeniaca* CBF- és DAM5-6 szekvenciák azonosítása és szerkezeti jellemzése

A 'Korai zamatos' genomi DNS-éből egy 756 bp hosszúságú fragmentumot amplifikáltunk az őszibarackra tervezett, CBF-F jelű forward primer (Barros és mts., 2012) és a CBF1 R reverz primer (Wisniewski és mts., 2011) alkalmazásával. Továbbá egy DAM5 (729 bp) és egy DAM6 (230 bp) típusú szekvenciát azonosítottunk a *PpDAM5/3-F* (Bielenberg és mts., 2008) és *PpDAM5/2-R* (Yamane és mts., 2011), valamint *PpDAM6/3* (Bielenberg és mts., 2008) primerpár és a 'Zard' virágrügyből izolált cDNS templát használatával. A szekvenciákat benyújtottuk az NCBI GenBank adatbázisába, ahol az MH464453, MH464454 és MH464455 azonosító szám alatt találhatók meg.

A homológia vizsgálat eredményei alapján a *ParCBF1* a *Prunus mume* *CBF/DREB1* szekvenciával, a *ParDAM5* pedig az őszibarack (*PpDAM5*) és a japán kajszli (*PmDAM5*) mutatták a legnagyobb mértékű egyezést. A *ParDAM6* szekvencia jelentős hasonlóságot mutatott a *P. pseudocerasus*, japán kajszli és őszibarack szekvenciákhoz. A szekvenciák aminosav-szintű illesztése alapján azonosítottuk a CBF- és DAM transzkripciós faktorok jellegzetes fehérje-motívumait, a *ParCBF1* esetében az AP2 domént, a *ParDAM5* esetében a MADS-, K- és I-doménokat. Továbbá a *ParDAM5-6* fehérjék esetén azonosítottunk olyan jellegzetes szekvencia-motívumokat is, melyek által elkülöníthetők a többi DAM transzkripciós faktortól.

Az újonnan azonosított kajszli szekvenciák homológiájának és funkcióképességének további alátámasztása céljából számos egyszikű és kétszikű fajból korábban azonosított CBF- és DAM aminosav-szekvenciával végeztünk filogenetikai analízist, melyhez a legnagyobb valószínűség módszerét

alkalmaztuk. A Rosaceae fajok mindkét esetben egy közös kládot képeznek a kétszikűekből származó szekvenciákon belül, melyen belül az almatermésűek (Maloideae) és csonthéjasok (Prunoideae) két jól elkülöníthető csoportot alkotnak. A *Prunus* CBF szekvenciák ugyan nem alkottak fajspecifikus kládokat, de az elemzés alapján mind besorolható volt olyan, statisztikailag is alátámasztott alcsoportokba, melyek az egyes fajokból származó szekvenciákat vegyesen tartalmazták. Ide az általunk azonosított *ParCBF1* is beilleszkedik, és a *P. mume* CBF1-el mutatta a legközelebbi rokonságot. A *Prunus* DAM szekvenciák kládja a hat különböző DAM transzkripciós faktor alapján hat alcsoportra ágazott, melyekbe az újonnan azonosított *Prunus armeniaca* DAM5 és DAM6 szekvenciák is besorolhatók. A *ParDAM5* szekvencia a *P. mume* DAM5 szekvenciával, még a *ParDAM6* a *P. persica* homológ szekvenciával mutatta a legközelebbi rokonságot. Az elemzés alapján elmondható, hogy a *ParCBF1*, a *ParDAM5* és a *ParDAM6* evolúciós kapcsolatban áll a rokon fajokból származó *CBF*, *DAM5* és *DAM6* génekkel, és feltehetően azonos funkciót töltenek be a kajszi esetében.

4.2. A *ParCBF1* és *ParDAM5-6* gének funkcionális jellemzése

Az azonosított kajszi gének részletes szerkezeti elemzése után a funkcionalitás vizsgálatát is elvégeztük. Ehhez elsőként meghatároztuk a kísérletbe bevont kajszi fajták hidegigényét ún. hidegegység (chill unit) értékekben az Utah modell esetében, illetve hideg-adag (chill portion) értékekben a dinamikus modell esetében az októbertől márciusig terjedő időszakban. A vizsgált kajszi fajták hidegigényét tekintve a korai virágzású ‘Aurora’ és a ‘Goldrich’ mindkét modell számításai alapján kisebb hidegigénnyel rendelkezett a kései virágzású ‘Stella’ és ‘Zard’ fajtákhoz képest. Ez a különbség mind a két évjáratban látható volt. Az ‘Aurora’ és a ‘Goldrich’ virágzási ideje mindkét évben ugyanarra a napra esett, még a ‘Stella’ és ‘Zard’ virágzása 2015/16-ban egy nappal korábban következett be.

A *ParCBF1* expressziós szintje mindkét évjáratban a nyugalmi időszak elején december-január első felében volt a legmagasabb. Ebben az időszakban szignifikáns különbségeket találtunk a korai- és a kései virágzású fajták között, a legmagasabb értékeket a 'Zard' fajta esetében mértünk. Január végétől kezdve a *ParCBF1* expressziós szintje minimálisra csökkent mind a négy fajtánál, a külső hőmérsékleti értékek alakulásától függetlenül.

A *ParDAM5-6* gének expressziója jellegzetes, mind a két vizsgált nyugalmi időszakban azonos tendenciát mutatott. A nyugalmi időszak elején emelkedni kezdett, majd a legnagyobb expressziós értékeket 2015 novemberében, illetve 2016 decemberében mértük, ezután mindkét gén transzkripcióját fokozatosan csökkenő tendencia jellemezte, mely összefüggést mutatott az addig felhalmozott hideghatás mértékével – ezt az ábrán a vonaldiagram jelöli, a hidegegység értékek feltüntetésével. Mindkét évjáratban szignifikáns különbségeket figyeltünk meg egyes fajták esetében, a kései virágzású fajtáknál a csökkenést követően magasabb értékeket mértünk.

Összehasonlítva a *ParCBF1* és a *ParDAM5-6* gének transzkripciós aktivitását elmondható, hogy mindkét évben megfigyeltünk közöttük kapcsolatot. A nyugalmi időszak elején a nagyobb *ParCBF1* expressziós értékeket mutató fajtáknál a *ParDAM5-6* esetében is nagyobb transzkripciós aktivitást mértünk. Ebből arra következtettünk, hogy a *ParCBF1* részt vesz a *ParDAM5-6* gének szabályozásában, legalább is a nyugalmi időszak elején.

A mikrosporogenezis vizsgálatok eredményét tekintve szintén figyeltünk meg különbségeket a korai- és kései virágzású fajták között. A pollenanyasejtek kialakulása január végéig végbement, ezt követően a két korai virágzású fajtánál elindult az osztódás, amit a tetrád állapot jelez. Ez a két másik fajtánál egy héttel később következett be. A korai virágzású fajtáknál február közepére, a kései fajtáknál február végére alakultak ki a mikrospórák, március elejére pedig az érett pollenszemek. A korai- és kései virágzású fajták mikrospórafejlődés-

menetében megfigyelt eltérés egybeesik a fajták hidegigényének teljesülésével. Mind a négy fajta esetében akkor figyeltük meg a tetrád állapotot, amikor megkapta a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegthatást. Maga az osztódás folyamata a génexpresszió csökkenésével párhuzamosan indul el. A két korai virágzású fajtánál ez a csökkenés hamarabb bekövetkezik. Legalacsonyabb expressziós szintet a tetrád állapotnál mértünk.

4.3. Az érési idő és az őszibarack NAC-genotípusok között megfigyelt összefüggés

Vizsgálataink során egy érési idő tekintetében igen változatos őszibarack-fajtagyűjtemény genotipizálását végeztük el azzal a céllal, hogy előzőleg egy szűk genetikai hátterű növényanyagon felismert összefüggést statisztikailag megbízható adatokkal támasszuk alá. A szakirodalomból átvett és fluoreszcens jelöléssel ellátott NAC-indel specifikus primer használatával 125 olyan őszibarack fajtából származó mintán végzetünk PCR reakciót. A fragmentumhossz-analízis alapján három jól elkülöníthető genotípus határozható meg: 1) homozigóta a 192 bp hosszúságú 'Lovell' fajtában leírt referencia allélra, 2) homozigóta az inszerciót tartalmazó 201 bp hosszúságú allélra, 3) heterozigóta genotípus, mely mind a 192 bp, mind a 201 bp hosszúságú allélt hordozza.

A 192-es allélra homozigóták kisebb gyakorisággal fordultak elő a korai- és a középidei érési kategóriában, a 201-es alléra homozigóták jelenléte pedig a középidei és kései érésidő kategóriákban alulreprezentált. Ezt az összefüggést a statisztikai vizsgálat is megerősítette, a NAC-genotípus és az érési idő között szignifikáns kapcsolat volt kimutatható.

4.4. *Prunus* NAC szekvenciák azonosítása

A kérdéses NAC-szekvencia nem csak az őszibarackban, hanem az általunk vizsgált rokon fajokban is kimutatható volt a PCR reakció során. A fluoreszcensen jelölt NAC-indel specifikus primerrel az esetleges fajon belüli szekvencia-variációk azonosítása volt a cél a gén azon szakaszán, ahol az őszibarack korai érését kialakító mutáció is bekövetkezett. Az őszibarackra jellemző vagy ahhoz hasonló mutáció azonban nem tudtunk azonosítani a többi faj esetében. A mandulafajtáknál egy, az őszibarack referenciaalléllal megegyező méretű fragmentum, a kajszai- és európai szilvafajtáknál szintén egy, 188 bp hosszúságú fragmentum volt detektálható. A meggyfajták közül a ‘Korai pipacsmeggy’ és a ‘Piramis’ esetében egy 189 bp hosszúságú ampikon volt azonosítható. Egyedül a ‘Kántorjánosi 3’ meggyfajtában találtunk két különböző méretű fragmentumot.

A rokon *Prunus* fajok szekvencia-illesztése nagyfokú egyezést mutatott az őszibarack referencia genom megfelelő régiójával. Összesen 74 esetben volt detektálható SNP (single nucleotide polymorphism) a részleges NAC-domén szekvencia kódoló régiójában, ebből 25 szinonim, 49 nem szinonim (aminosav-cserét eredményező), illetve egy nonszensz egy-nukleotidos báziscsere volt. Három nem-konzervatív aminosav-cserét azonosítottunk a kajszai és meggy allélok esetében, valamint egy nonszensz mutációt a ‘Korai pipacsmeggy’ fajtában. Ezek okozhatnak olyan változást a fehérje térszerkezetében, amely hatással van a funkcióképességére, ám ahhoz, hogy ezt bizonyítsuk, további vizsgálatok szükségesek.

4.5. Új tudományos eredmények

1. Egy 756 bp hosszúságú *C-repeat Binding Factor (CBF)* fehérjét kódoló részleges génszekvenciát azonosítottunk a *P. armenica* ‘Korai zamatos’ genomi DNS-éből. A szekvencia az MH464453 azonosítószámmal került felvételre az NCBI GenBank adatbázisába. A *ParCBF1* szekvencia azonosításához az NCBI adatbázisban fellelhető rokon *Prunus* fajok *CBF* szekvenciáival homológiavizsgálatot és filogenetikai elemzést végeztünk el.
2. Egy fehérjeszerkezet jóslására alkalmas szoftver segítségével elkészítettük a *ParCBF1* CBF transzkripciós faktorokra jellemző AP2 DNS-kötő doménjének térszerkezetét.
3. A *Dormacy Associated MADS-box 5* (729 bp) és *6* (230 bp) transzkripciós faktorokat kódoló szekvenciát azonosítottunk a *P. armenica* ‘Zard’ virágrügyből izolált cDNS-ből. A szekvenciák az MH464454 és MH464455 azonosító számmal kerültek fölvetelre az NCBI GenBank adatbázisába. A *ParDAM5* és *ParDAM6* szekvenciák azonosságát az NCBI adatbázisban fellelhető rokon *Prunus* fajok *DAM*-típusú szekvenciáival végzett homológiavizsgálattal és filogenetikai elemzéssel bizonyítottuk. A prediktált aminosav-szekvencia alapján illesztéseket készítettünk, melyben azonosítani tudtuk a DAM-fehérjékre jellemző motívumokat.
4. A *ParDAM5* esetében elkészítettük két jellegzetes fehérje-domén, az M-domén és a K-domén térszerkezeti modelljét.
5. Génexpressziós vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a *ParCBF1* aktivitását a téli nyugalmi időszak alatt az alacsony hőmérséklet határozza meg, míg a *ParDAM5-6* expresszióját feltehetően részben a *ParCBF1* transzkripciós faktor, részben a vizsgált fajták hidegigényének teljesülése szabályozza.

6. Megállapítottuk, hogy két korai és két kései virágzású kajszifajta virágrügyeiben a mélynyugalom megtöréséhez szükséges hidegigény teljesülésével a *ParDAM5-6* expressziója szignifikánsan csökken, ezzel egyidőben megjelenik a pollenen-anyasejtek osztódását követő ún. „tetrád” állapot.
7. Meghatároztuk 125, eltérő pomológiai tulajdonságokkal rendelkező őszibarackfajta *NAC*-genotípusát. Statisztikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az általunk vizsgált őszibarackfajták *NAC*-genotípusa és érési ideje között szignifikáns kapcsolat van. Ezzel bizonyítottuk a *PpNAC1* funkcionális markerként való alkalmazhatóságát érési időre történő szelekció során.
8. Rokon *Prunus* fajok genomi DNS-mintáival végzett PCR-vizsgálattal igazoltuk az őszibarack érési idejét befolyásoló *NAC* gén homológ szekvenciáinak jelenlétét az összes vizsgált csonthéjas gyümölcsfajban. A PCR-termékek klónozásával és szekvenálásával 15 új, a *PpNAC1*-gyel homológ részleges génszekvenciát azonosítottunk kajszii (*P. armeniaca*), mandula (*P. dulcis*), európai szilva (*P. domestica*) és meggy (*P. cerasus*) esetében. Ezekben a szekvenciákban összesen 69 esetben azonosítottunk SNP-t (single nucleotide polymorphism) a részleges *NAC*-domén szekvencia kódoló régiójában, melyek további vizsgálata segítheti a gének szerepének tisztázását.

5. EREDMÉYNEK MEGVITATÁSA

5.1. A *P. armeniaca* CBF- és DAM5-6 homológ gének szerkezeti- és funkcionális vizsgálata

Az újonnan azonosított *ParCBF1* aminosav-szintű illesztése alapján azonosítani tudtuk az AP2 domént és a CBF-típusú fehérjék más, jellegzetes motívumait is. Az AP2 és PKK domének jelenléten szükséges feltétele annak, hogy a kajszi *ParCBF1* gén működőképes transzkripciós faktort kódoljon. A *ParCBF1* molekuláris szerkezetének modellje megbízhatónak bizonyult és megfelelt az AP2 jellegzetes térszerkezetének, melynek fő elemei a három béta-lemez és egy, ezekkel majdnem párhuzamos alfa-hélix szerkezet, mely lehetővé teszi nyolc egymást követő aminosav kapcsolódását, melyek a DNS nagy árkához kötődnek, tovább erősítve az azonosított *ParCBF1* fehérje működőképességét. A CBF transzkripciós faktorok specifikusan kötődnek a CRT/DRE elemhez, amely a *DAM* gének promóterében is megtalálható. Ezt a lehetséges szabályozási kapcsolatot az AP2 domén intakt szerkezete is alátámasztja.

Őszibarackban és japán kajsziban hat *DAM* gént azonosítottak (Bielenberg és mts., 2008), melyek közül kettő (*DAM5* és *DAM6*) bizonyítottan a mélynyugalom megszűnésének szabályozásához volt köthető az őszibarack esetében (Yamane és mts., 2011). Az általunk azonosított *ParDAM5* aminosav szekvencia-illesztése alapján a MADS-box fehérjék II. típusú (MIKC^C) alcsaládjára jellemző összes fontos fehérjedomént (MADS-domén, I-régió és K-domén) azonosítani tudtuk, melyek szerkezeti modellje a GMQE és QMEAN mutatók alapján megbízható volt. Ezek az eredmények megerősítik a *P. armeniaca* *DAM5* és *DAM6* transzkripciós faktorokat kódoló gének működőképességét.

A *CBF* gének a hőmérséklet csökkenésére gyorsan indukálódnak *Arabidopsis* növényekben (Stockinger és mts., 1997), de fás növényeknél is megfigyelték ezt a tendenciát (Wisniewski és mts., 2011; Zhang és mts., 2013), Eredményeink alapján a *ParCBF1* gén a csökkenő hőmérséklet hatására szintén nagymértékben expresszáldott, ami igazolja az alacsony hőmérsékleti stresszválaszban betöltött szerepét.

Az eddig azonosított *Rosaceae* *DAM5-6* gének promoterrégiója tartalmazza a CBF transzkripciós faktorok kötőhelyét képező jellegzetes CCGAC motívumot (Wisniewski és mts. 2011; Yamane és mts., 2011), ami arra utal, hogy ezek a gének is részei a CBF-regulonnak. A *ParDAM5* és *ParDAM6* gének, őszibarack- és japán kajszi-homológjaikhoz hasonlóan (Yamane és mts., 2011), nagymértékű transzkripciós aktivitást mutattak a nyugalmi időszak kezdetén, melynek mértékét elsősorban a hidegindukálható *ParCBF1* expressziós rátája, valamint a fajta hidegigénye határozta meg. A *ParDAM5* és *ParDAM6* expresszója és a minimum hőmérsékleti értékek között összefüggés mutatható ki: 2015 decemberében, ahol a mintagyűjtés napján hidegebb volt, mint a 2016-os évben, mind a négy fajta estében nagyobb *ParCBF1* és *DAM5-6* expressziós értékeket mértünk. A nyugalmi időszak második felében szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a korai- és kései virágzású kajszi-fajták expressziós mintázatában, ami arra utal, hogy a *ParDAM5-6* működését az adott fajtára jellemző, a mélynyugalom megszűnéséhez szükséges hidegigény is befolyásolja.

Magyarország átlaghőmérséklete az elmúlt évszázadban közel 0,8 °C-kal emelkedett (Lakatos és mts., 2011). Ennek hatására utóbbi 24 év vizsgálatai alapján a kajszi-fajták mélynyugalmi periódusa 19–23 nappal tolódott korábbra, még virágzásuk átlagosan 3 nappal korábban következik be (Szalay és mts., 2019). A csonthéjas gyümölcsfajok, köztük a kajszi virágrügyek nyugalmi állapotát szabályozó gének azonosítása és működésük jellemzése kulcsfontosságú információkkal szolgál a termesztőknek és a nemesítőknek. Az

újonnan azonosított *ParCBF1*, a *ParDAM5* és a *ParDAM6* gének rendelkeznek azokkal a szerkezeti sajátosságokkal, valamint a genetikailag és környezeti tényezők által meghatározott expressziós mintázattal, ami valószínűsíti, hogy ezek a gének fontos elemei a kajszi nyugalmi állapotát szabályozó molekuláris rendszernek.

5.2. A *PpNAC1* funkcionális markerként való alkalmazhatósága

Az őszibarack *NAC* gén C-terminális régiójában található 9 bp inszerció jelenléte és a korai érés között feltételezhető összefüggést Pirona és mts. (2013) két hasadó populáción végzett vizsgálatai valószínűsítették. Munkánk során 125, eltérő érésidejű őszibarackfajtát genotipizáltunk, hogy igazoljuk a *PpNAC1* gén hatását és molekuláris markerként való alkalmazhatóságát. A statisztikai elemzések (szignifikancia-vizsgálat khí-négyzet próbával, Goodman-Kruskal mutató) a két változó, a *NAC*-genotípus és az érési idő-kategória között igen szoros kapcsolatot mutattak ki. Az eredmények alapján tehát a *PpNAC1* megbízható marker lehet az őszibarack nemesítés során az érési időre történő szelekció esetében.

Mind a korai, mind a kései érési kategóriában találtunk olyan fajtákat, melyek genotípusa eltért ettől az általános tendenciától. A korai érésű 'Favorita Moretti' (július első dekádja) és 'Kínai 8' (július második dekádja) a 192 bp allélra voltak homozigóták, a kései érésű 'Royal Pride' (augusztus vége), 'Harken' és 'Orion' (szeptember 1. dekádja) pedig a 201 bp allélt hordozták homozigóta formában. Ez arra utal, hogy az érési idő meghatározásában más lokuszok is közreműködnek, hiszen a *NAC* fehérjék egy összetett hálózat részei, mely több, a gyümölcséréshez köthető folyamatot szabályoz.

6. FELHSZNÁLT IRODALOM

Barros, P. M., Goncalves, N., Saibo, N.J.M., Oliveira, M.M. (2012): Functional characterization of two almond C-repeat binding factors involved in cold response. *Tree Physiol*, 32: 1-16.

Bielenberg, D.G., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G.L.R., Scorza, R., Abbott, A.G. (2008): Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet Genomes* 4: 495–507.

Dirlewanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W., Arús, P. (2004): Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *P Natl A Sci USA*, 101: 9891-9896.

Fishman, S., Erez, A., Couvillon, G. A. (1987): The temperature dependence of dormancy breaking in plants: mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *J Theor Biol*, 124: 473–483.

Hanninen, H., Tanino, K. (2011): Tree seasonality in warming climate. *Trends Plant Sci*, 16: 412–416.

Eduardo, I., Pacheco, I., Chietera, G., Bassi, D., Pozzi, C., Vecchietti, A., Rossini, L. (2011): QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect. *Tree Genet Genomes*, 7: 323-335.

Jaakola, L., Pirttilä, A. M., Halonen, M., Hohtola, A. (2001): Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol Biotechnol*, 19: 201–203.

- Lakatos, M., Szentimrey, T., Bihari, Z. (2011): Application of gridded daily data series for calculation of extreme temperature and precipitation indices in Hungary. *Időjárás*, 115: 99–109.
- Li, Z., Reighard, G.L., Abbott, A.G., Bielenberg, D.G. (2009): Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *J Exp Bot*, 60: 3521–3530
- Pedryc, A., Korbuly, J., Szabó, Z. (1999): Artificial frost treatment methods of stone fruits. *Acta Hortic* 488: 377–380 Reichmann, J. L., Meyerowitz, E.M., 1997. MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378, 1079–1101.
- Pirona, R., Eduardo, I., Pacheco, I., Linge, C.D.S., Miculan, M., Verde, I., Tartarini, S., Dondini, L., Pea, G., Bassi, D., Rossini, L. (2013): Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach. *BMC Plant Biol*, 13: 166.
- Richardson, E. A. (1974): A model for estimating the completion of rest for ‘Redhaven’ and ‘Elberta’ peach trees. *HortScience*, 9: 331–332.
- Rohde, A., Bhalerao, R. P. (2007): Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci*, 12: 217–223.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997): *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a cisacting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 1035–1040.
- Szalay, L., Pedryc, A., Szabó, Z. (1999): Dormancy and cold hardiness of flower buds of some Hungarian apricots. *Acta Hortic* 488: 315–320.

Szalay, L., Froemel-Hajnal, V., Bakos, J., Ladányi, M. (2019): Changes of the microsporogenesis process and blooming time of three apricot genotypes (*Prunus armeniaca* L.) in Central Hungary based on long-term observation (1994–2018). *Sci Horticulture-Amsterdam*, 246: 279–288.

Wisniewski M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T., Macarisin, D. (2011): Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus × domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*, 233: 971–983.

Weaver, R. F., Hedrick, P. W. (1997): Genetics. Dubuque, Iowa: WM.C. Brown Publishers.

Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Sasaki, R., Tao, R. (2011a): Expressional regulation of PpDAM5 and PpDAM6, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *J Exp Bot*, 62: 3481–3488.

Zhang, J., Yang, W. R., Cheng, T. R., Pan, H. T., Zang, Q. X. (2013): Functional and evolutionary analysis of two CBF genes in *Prunus mume*. *Can J Plant Sci*, 93: 455–464.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Impakt faktoros folyóiratcikkek

Balogh E., Halász J., Szani Zs., Hegedűs, A. (2018): Correspondance between maturity date and molecular variations in a *NAC* transcription factor of diploid and polyploid *Prunus* species. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 48(1). **IF: 1,731** (doi:10.3906/tar-1711-19)

Balogh, E., Soltész, A., Erős-Honti, Z., Gutermuth, A., Höhn, M., Vágújfalvi, A., Galiba G., Hegedűs, A. (2019). Identification, structural and functional characterization of dormancy regulator genes in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 402. **IF:4,106** (doi:0.3389/fpls.2019.00402)

Lektorált folyóiratban (MTA listás) megjelent közlemények

Balogh, E., Halász, J. (2016): Csonthéjas gyümölcsök életciklusát szabályozó transzkripciós faktorok szerepe. *Kertgazdaság*, 48 (1) p. 19-27.

Balogh, E., Halász, J. (2017): CBF gének izolálása diploid és poliploid *Prunus*-fajokból. *Kertgazdaság*, 49. (2) p. 9-17.

Konferencia közlemények és összefoglalók

Balogh E., Hegedűs A., Szalay L., Halász J. (2019): A mélynyugalmi állapot és a *SOCI*-genotípusok közötti összefüggés őszibarackfajták esetében. XXV. Növénynevelési Tudományos Napok, 2019. március 6-7., Összefoglalók (Szerk.: Veisz O.), MTA, Budapest, p. 66. ISBN 978-963-8351-45-6.

Balogh, E., Hegedűs, A., Halász, J. (2016): Funkcionális marker tesztelése őszibarack érési idejének meghatározására. XXII. Növénynevelési Tudományos Nap, 2016. március 10., Összefoglalók (Szerk. Veisz, O., Polgár, Zs.) MTA Budapest, p. 68. ISBN 978-963-369-085-1

Balogh, E. (2016): Érés időt szabályozó NAC-transzkripciós faktorok vizsgálata csonthéjas gyümölcsfajokban. XV. Genetikai Műhelyek Magyarországon Minikonferencia, Szeged, 2016. 09. 16. (Videoposzter)

Balogh, E., Halász, J. (2017): *CBF* gének azonosítása és jellemzése *Prunus* fajokban. XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap, 2017. március 07., Összefoglalók (Szerk.: Veisz O.), MTA, Budapest, p. 81. ISBN 978-963-8351-44-9.

Balogh E., (2017): Analysis of genes encoding dormancy associated transcription factors in stone fruits. 4th Transylvanian Horticulture and Landscape Studies Conference. (Ed. Benedek, K.). Sapientia University, Târgu Mureș, Romania. Book of Abstract (Ed. Klára Benedek) pp. 4.

Balogh E., Bolvári-Soltész A Vágújfalvi A., Höhn M., Erős-Honti Zs., Gutermuth Á., Halász J., Hegedűs A. (2018): Csonthéjas gyümölcsök nyugalmi állapotát befolyásoló transzkripciós faktorok vizsgálata. XXIV. Növénynevelési Tudományos Nap, 2018. március 06. Összefoglalók (Szerk.: Veisz O.), MTA, Budapest, p. 66. ISBN 978-963-8351-44-9.

Halász J., **Balogh E.,** Soltész A., Vágújfalvi A., Galiba G., Szalay L., Hegedűs A. (2019): Structural and functional analysis of endodormancy-regulator genes in apricot (*Prunus armeniaca* L.). XV. Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics (ISHS), June 3-7, Prague, Czech Republic