

A spontán szervspecifikus mutáns *Adh1-FFFF* mintázata az anaerob scutellumban és a pollenben a mutáns allél dóziséjától függően

Az autotetraploid Wf9 kukorica vonalban olyan mutáns *Adh1-F* allélt hordozó egyedek találhatóak, amelyeknél anaerob körülmények között a scutellumban normális vagy csökkent az *Adh-1* aktivitás, míg a pollenszemekben nincs, vagy lényegesen kevesebb, mint a vad típusúakéban (HAJÓSNÉ és H. NAGY 1995). A mutáns F allélt hordozó egyedeket 10 éve öntermékenyítéssel tartjuk fenn a SZIE, MKK Genetika és Nemesítés Tanszéken. A szervspecifikus mutáns fenotípus tíz egymást követő generáción keresztül átadódott.

A spontán létrejött mutánsnak az anaerob scutellumban egyszávos homozigóta mintázata van. Ez, attól függően, hogy a négy kromoszóma szegmentum közül hány hordozza a mutáns F allélt, az alábbi négyféle *Adh1-mF* genotípusból jöhet létre: *Adh1-mFFFF*, *Adh1-mFmFFF*, *Adh1-mFmFmFF* és *Adh1-mFmFmFmF*. Ezek öntermékenyítésekor a következő scutellum genotípusok, illetve pollenszemek keletkezhetnek:

Egy mutáns F allél esetén :

Scutellum genotípusok: 1 mFmFFF : 2 mFFFF : 1 FFFF;

Pollen: sötétlila (100% ADH aktivitás) és világos lila (csökkent ADH aktivitás).

Két mutáns F allél esetén

Scutellum genotípusok:

1 mFmFmFmF : 8 mFmFmFF : 18 mFmFFF : 8 mFFFF : 1FFFF

Pollen: sárga, világos lila vagy sötét lila.

Három mutáns F allél esetén

Scutellum genotípusok: 1 mFmFmFmF : 2mFmFmFF : 1 mFmFFF

Pollen: sárga vagy világos lila.

Négy mutáns F allél

Scutellum: 100% mF

Pollen: 100% sárga, áttetsző, ADH hiányos (1. ábra).

A mutáns *Adh1-F* allél öröklődésének tanulmányozása az F₁ nemzedék scutellumában és pollenében

A szervspecifikus mutáció öröklődésének tanulmányozására a vad típusú allélra (*Adh1-SSSS*) homozigóta növényeket kereszteztünk a mutáns F allélra homozigótával. A keresztezéseket elvégeztük mind a két irányba. A gyors és a lassú allélra homozigóta egyedek keresztezése után a dimer enzim esetében az anaerob scutellumban három sáv mintázat várható 1:2:1 intenzitási arányokkal. Ez azonban csak akkor lesz így, ha az F allélt adó anyától vagy apától két normális F allél vesz részt a megtermékenyítésben. Az F₁ genotípusát, továbbá a sávok számát és intenzitását a megtermékenyítésben résztvevő mutáns F allélek száma fogja meghatározni. Az alábbi esetek lehetségesek:

Egy mutáns allél van, amely a vad típussal történő keresztezés után 1:1 arányban képez *Adh1-mFF/Adh1-SS* és *Adh1-FF/Adh1-SS* heterozigótákat. A pollen szemek diploidok, mFF; mFS; FS és SS genotípusúak.

Két mutáns F allélja van az egyik szülőnek, és így a keresztezés után 1:4:1 arányban lesznek 0,1 és 2 mutáns F allélt hordozó F₁ scutellumok. A pollenszemek mFmF; mFS; SS; mFF; FF és FS genotípusúak. Az mFmF genotípusúak valószínűleg ADH hiányosak, és ezért sárgák.

Három mutáns F allél esetén az F₁ scutellumokban azonos arányban lehet találni 1 vagy 2 mutáns allélt hordozó genotípusokat. A pollenszemek mFmF; mFF; mFS; FS és SS összetételűek. Az mFmF pollenek valószínűleg sárgák.

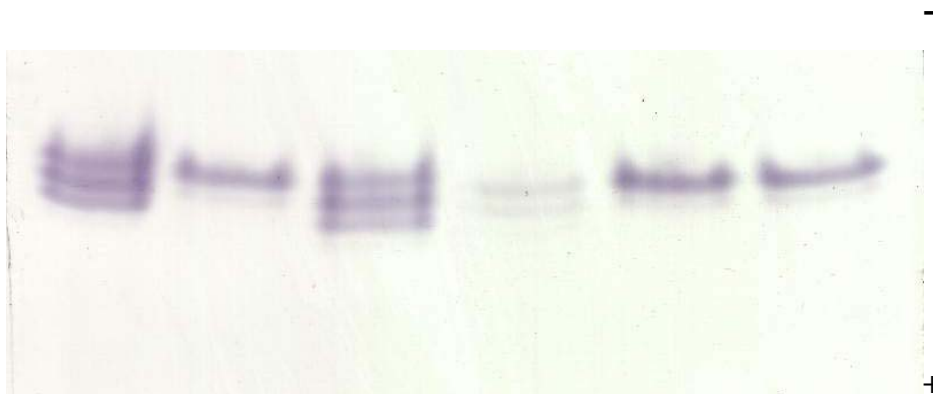
Az egyik szülő csak mFmF gamétákat képez, ezért minden F₁ utód *Adh1-mFmF/Adh1-SS* genotípusú. Pollenszemeik pedig mFmF; mFS és SS összetételűek. Tehát ismét várható az ADH hiányos pollenszemek megjelenése.

Az elektroforézis és az enzim specifikus festés után a géllapokon a három különböző F₁ csőről levizsgált 17 db szem scutellumában 8 esetben volt három sáv, 8 esetben két sáv és egy esetben egy sáv, SSSS homozigóta mintázat. Ez utóbbi két eltérő homozigóta keresztezése után normális esetben nem lehetett volna. Feltételezzük, hogy az egysáv mintázat esetén az F₁ nemzedék az *Adh1-mFmF/Adh1-SS* genotípusú lehetett, amikor is F·F homodimerek egyáltalán nem képződtek. A két sáv mintázatok, az S·S homodimerek és az S·F heterodimerek megléte, az F·F homodimerek hiánya viszont *Adh1-mFF/ Adh1-SS* genotípusra enged következtetni. Mindezek azt bizonyítják, hogy a mutáns F allél a keresztezés irányától függetlenül öröklődött (2.,3.,4. és 5. ábrák).

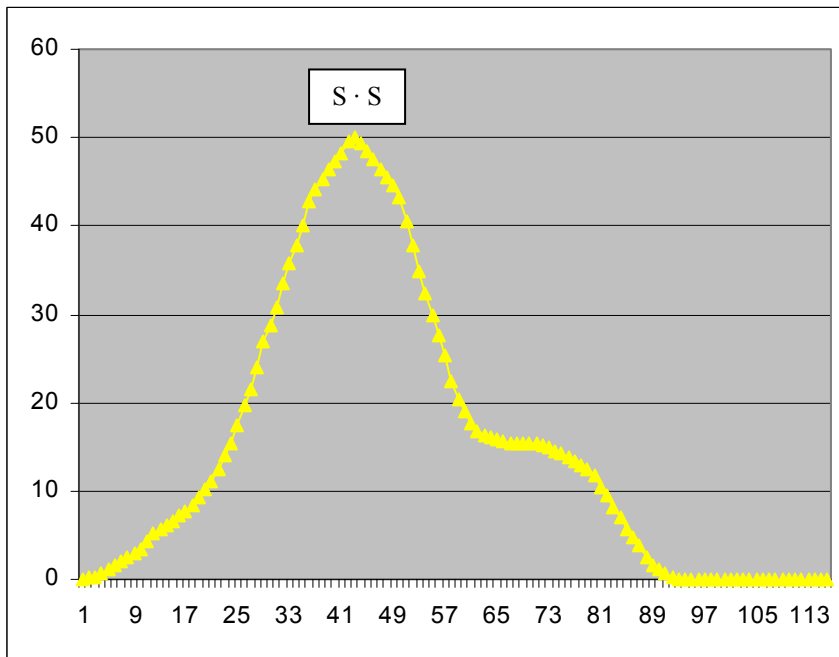
A denzitogramok alapján meghatároztuk az S és az F allélek gyakoriságát is. Normális esetben a scutelluban a két allél szintézis rátája azonos. Mutáns allél esetén azonban a vad típussal történő keresztezés után az F_1 nemzedék scutellumában S allél 74%-ban, az F allél pedig csak 26%-ban járult hozzá az összes ADH1 aktivitáshoz. Vagyis a mutáns F allél 24%-kal kevesebb alegységet szintetizált. A 17 esetből négyben a szintézis ráta megközelítette az 50:50 %-ot (1. táblázat).



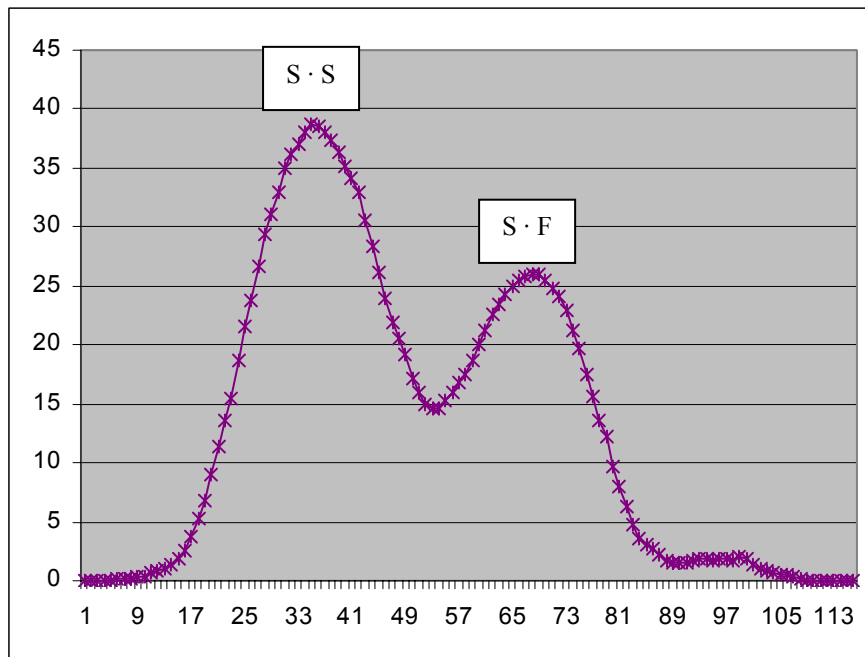
2. ábra. 1,2 és 3 sávós ADH1 mintázatok az F_1 nemzedékben.



3. ábra. 1,2 és 3 sávós ADH1 mintázatok az F_1 nemzedék anaerob scutellumában



4. ábra. Egy sáv ADH1 mintázat denzitogramja az F_1 nemzedék anaerob scutellumában.

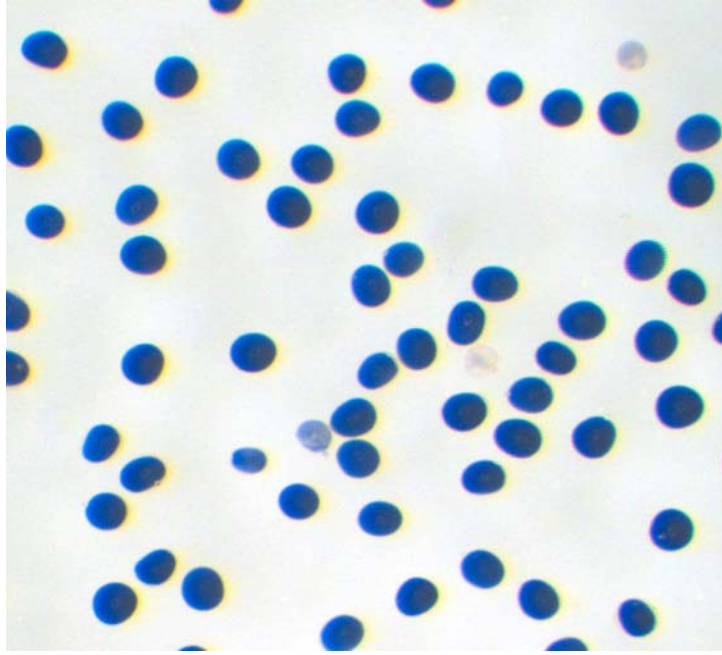


5. ábra. Két sáv ADH1 mintázat denzitogramja az F_1 nemzedék anaerob scutellumában.

1. táblázat. *Adh1-F* és *Adh1-S* allélok %-a az F₁ nemzedékben az anaerob scutellum denzitogram értékei alapján

Sorszám	S · S %	F · S %	F · F %	<i>Adh1-S</i> %	<i>Adh1-FFFF</i> %
1	71,5	28,5	0	85,75	14,25
2	48,5	36,5	15,0	66,75	33,25
3	35,3	37,7	27,1	54,2	45,8
4	72,1	27,90	0	86,1	13,9
5	47,1	37,5	15,4	65,85	34,15
6	50,6	37,8	11,5	69,5	30,4
7	34,7	39,1	26,2	54,7	45,3
8	38,1	39,4	22,5	57,8	42,2
9	38,7	38,4	22,8	57,9	42,1
10	60,4	39,6	0	80,2	19,8
11	100%	0	0	100	0,0
12	37,4	41,0	21,6	57,9	42,1
13	65,9	34,1	0	83,0	17,0
14	63,1	36,9	0	81,6	18,4
15	77,4	22,6	0	88,7	11,3
16	74,5	25,5	0	87,2	12,8
17	59,7	40,3	0	79,8	20,2
Átlag	54,8	33,1	9,5	73,9	26,1
Szórás	19,2	10,2	11,1	14,2	14,2

Az F₁ nemzedék pollenjének hisztokémiai vizsgálata csak a sötétlila, ADH aktivitással rendelkező pollenszemek jelenlétét mutatta ki. Ezeknek a fenotípusos revertánsoknak a denzitás értéke $78,2 \pm 9,1$ volt, míg a vad típusúaké $104,7 \pm 10,0$. A 78-as denzitás érték esetében tehát a szórást meghaladó, 25%-os intenzitás csökkenés következett be, amely azonos értékű a scutellumban megfigyelt 24%-os aktivitás csökkenéssel. Ezek a pollenszemek *Adh-mF/Adh-S*, vagy *Adh-F/Adh-S* genotípusúak lehetnek (6. ábra). A pollenszemek két sávú ADH1 mintázata az F · F homodimerek hiányára utalt.



6. ábra. Az F_1 nemzedék sötétlila pollenszemei

Az F₂ nemzedék eredményei

Az F₂ nemzedéket az F₁ egyedek öntermékenyítésével állítottuk elő. Az F₁ egyedek a keresztezés irányától függetlenül *Adh1-mFF/Adh1-SS* vagy *Adh1-mFmF/Adh1-SS* genotípusúak voltak. Egy *Adh1-mFF/Adh1-SS* genotípusú növény négyféle típusú gamétát képez öntermékenyítéskor 1:2:2:1 arányban, amelyből kilenc féle genotípus és 1, 2 vagy 3 sáv mintázat jöhet létre (2. táblázat). Duplexből és szimplexből lesz olyan, amelyben normális F allél van, de triplexből nem. A pollen szemek pedig, ha az F₁ nemzedék eredményei alapján igaz az, hogy egy vad típusú S allél vagy egy normális F allél jelenléte a pollenben helyreállítja az ADH aktivitást, akkor csak az mFmF pollenek lesznek sárgák, a többi lila lesz.

2. táblázat. *Adh1-mFF/Adh1-SS* vagy *Adh1-SS/Adh1-mFF* genotípusú F₁ egyed öntermékenyítése után keletkező F₂ scutellum genotípusok, sávszámok és pollen fenotípusok

<i>Geno-/fenotípus</i>	<i>Sávok száma</i>	<i>A pollen várható fenotípusa</i>
<i>Adh1-mFmFFF</i>	1	sárga és lila vagy rózsaszín
<i>Adh1-mFmFFS</i>	3 vagy 2	sárga és lila
<i>Adh1-mFFFS</i>	3	lila
<i>Adh1-mFmFSS</i>	3 vagy 2	sárga és lila
<i>Adh1-mFFSS</i>	3	lila
<i>Adh1-FFSS</i>	3	lila
<i>Adh1-mFSSS</i>	3, 2 vagy 1	lila
<i>Adh1-FSSS</i>	3	lila
<i>SSSS</i>	1	lila

A másik esetben, amikor minden F₁ növény scutellumában két mutáns F allél van, akkor a három féle gaméta random kombinációja öt féle genotípust ad (3. táblázat). Valamennyi heterozigóta genotípus tartalmazni fogja a mutáns F allélt. Ennek megfelelően annak ellenére, hogy az anaerob scutellum mintázata 0-3 sáv lehet, előfordulhat, hogy nem

találunk 3 sávost mintázatot a géllapokon. Az 1. genotípusú növényről, ha ez a genotípus felnevelhető, csak sárga pollen hullik. A 2. és 3-ról sárga és lila, a 4. és 5-ről pedig csak lila.

3. táblázat. *Adh1-mFmF/Adh1-SS* vagy *Adh1-SS/Adh1-mFmF* genotípusú F₁ egyed öntermékenyítése után keletkező F₂ scutellum genotípusok, sávszámok és pollen fenotípusok

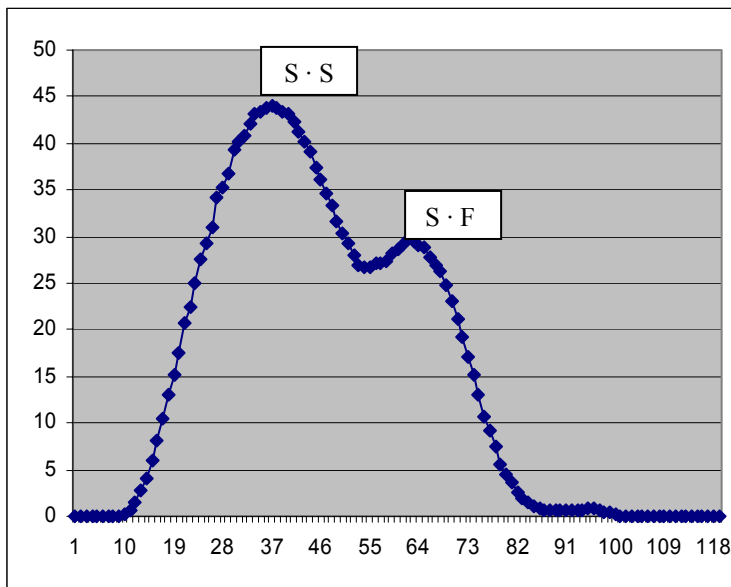
Sorszám	Geno-/fenotípus	Sávok száma	A pollen várható fenotípusa
1.	<i>Adh1-mFmFmFmF</i>	1 vagy 0	csak sárga
2.	<i>Adh1-mFmFmFS</i>	2 vagy 1	sárga és lila
3.	<i>Adh1-mFmFSS</i>	3 vagy 2	sárga és lila
4.	<i>Adh1-mFSSS</i>	3, 2 vagy 1	lila
5.	<i>Adh1-SSSS</i>	1	lila

Tehát az F₂ nemzedékben a heterozigóta mintázatok közül már nem csak a duplex jelenik meg, hanem a triplex (*Adh1-FFFS*) és a szimplex (*Adh1-FSSS*) is 9:6:1, illetve 1:6:9 intenzitási arányokkal. Ebben a nemzedékben már várható az egy sávost *Adh1-SSSS* homozigóta mintázat megjelenése, amelyet el kell különítenünk a mF allélek miatt létrejövő egy sávost mintázattól. A két sáv megjelenése a három helyett itt is ugyanazt fogja jelenteni, mint az F₁ nemzedékben; vagyis kevesebb és/vagy instabil F alegységet. Az *Adh1-FFFF* és *Adh1-FFFmF* genotípusú homozigóták kihalására ebben a nemzedékben még nem számíthatunk. Lehetnek viszont *Adh1-FFmFmF* és *Adh1-FmFmFmF* homozigóták. Az *Adh1mFmF/Adh1-SS* vagy az *Adh1-SS/Adh1-mFmF* genotípusok öntermékenyítése után nem várhatunk normális, 1:2:1, 1:6:9 vagy 9:6:1 intenzitási arányú heterozigóta mintázatokat. Pollen szinten csak kétféle fenotípus várható a sárga és a sötétlila. Az mFmF genotípusú pollenek sárgák, ADH hiányosak. Minden olyan pollenszem, amelyben egy vad típusú allél vagy egy normális F allél van, sötét lila. Rózsaszínű pollenek nem várhatók.

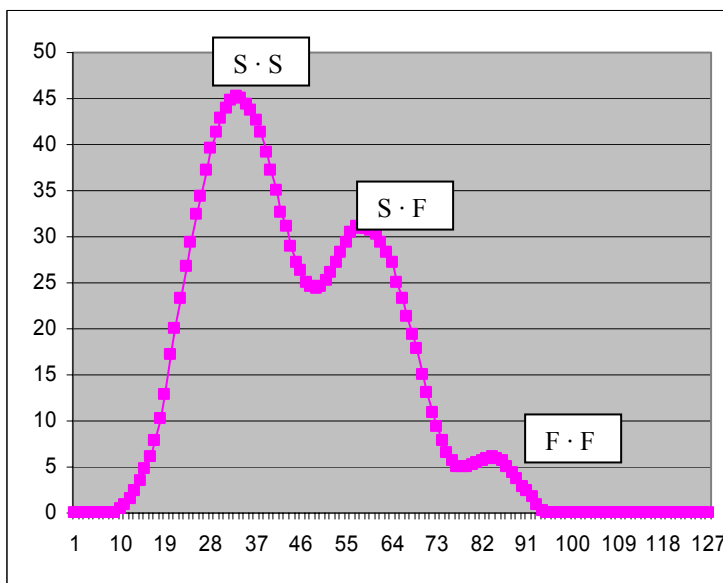
Az F₂ nemzedékben 9 csőről 64 szem scutellumból izoláltunk ADH1 izoenzim, és valamennyi mintázatot denzitometráltunk. Az enzimspecifikus festés után 55 db három sávost, 6 db két sávost (7. ábra) és 3 db egy sávost ADH1 mintázatot találtunk. Az utóbbi *Adh1-SSSS* homozigóta volt. Az 55 db három sávost mintázat közül csak 2 db olyan volt, amelynél a sávok intenzitása a szimplex genotípusnak, *Adh1-FSSS*-nek megfelelő 1:6:9 volt (8. ábra).

Normális duplex mintázatot - valószínűleg azért, mert kevés szemet vizsgáltunk - nem találtunk. A három sávú mintázatok többségénél a három féle heterozigóta típus – valószínűleg a mutáns F allélek jelenléte miatt - nem volt megkülönböztethető (9. ábra).

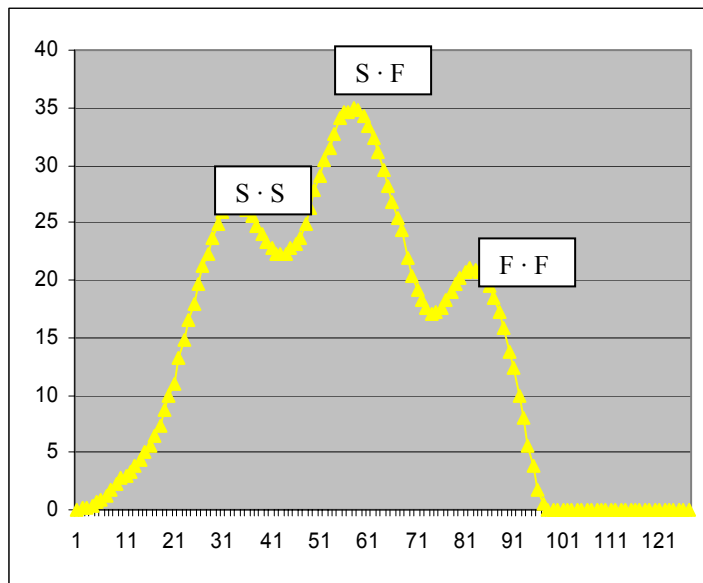
96 db F₂ pollen minta hisztokémiai festése után 94-nél csak sötét lila, revertáns, ADH⁺ polleneket láttunk, kettőnél pedig sárga, ADH hiányosakat. A lila pollenek denzitás értékei nem tértek el az F₁ nemzedékétől.



7. ábra. Két sávú ADH1 mintázat denzitogramja az F₂ nemzedékben.



8. ábra. Három sávú heterozigóta simplex (*Adh1-FSSS*) mintázat az F₂ nemzedékben.



9. ábra. Három sávós heterozigóta ADH1 mintázat az F_2 nemzedékben az eddigieknél több $F \cdot F$ homodimerrel.

Az F_1 nemzedék molekuláris analízise

Mivel a Chen és munkatársai (1987) által leírt *Adh1-3F1124* mutáns esetében éppen fordított az ADH1 aktivitás, mint a mi esetünkben; vagyis a pollenben van aktivitás, az anaerob scutellumban pedig a vad típusúénak csak kb. 6%-a. Továbbá, mert ők azt feltételezték, hogy a jelenséget egy kb. 2,0 Kbp *Mu1*-hez hasonló inszerció okozza az *Adh1* gén transzkripciós egységének az 5' végénél, ezért első megközelítésként mi is *Mu* inszerciót feltételeztünk a promoter régióban. Ennek megtalálására a következő primereket terveztük:

UGM-F 5' CAC CCC ACC AGT CCA CCA CCT 3'

OA-R 5' CTC CGC AAA TCT TCG AAC AGA ATC 3'

Az OA-R primer az *Adh1* gén promoterében van, az UGM-F pedig a struktúrgénben (10. ábra). A levizsgált *Adh1*-SSS vad típusú, a mutáns F allélt hordozó egyed, valamint a keresztezésükből származó F_1 egyedek PCR analízise után kapott ~ 320 bp fragmentumokat

kivágtuk, beklónoztuk és szekvenáltuk. A szekvenciák értékelésekor az egyik F₁ egyednél két eltérést találtunk az 5' nem transzlálódó régióban; a +46-nál G vagy A van, a +70-nél pedig C vagy T. A szekvenciánkat összehasonlítottuk a szekvencia bankban lévőkkel és azt az eredményt kaptuk, hogy ez egy *Ds* mutáns, amely az *Ac* elem jelenlétében revertálódott (11. ábra).

```

1      AGAAATTGGATGCTTATAAATAGGCCCTCAATGTCCTTGTGGGTTTATGAAATTTACATC
67     CCATTATTTTAAAAATAGACGAAGAATATGTTAGTAATTATGTATAAAAACTAGAAACTA
133    AAAAAAAGTCCAGTTACCTTTATCTAATTCCTTTTATAAGCTAATTTTATAGACACTG
199    AGAAACTGTTTTTAAAAAAGTGGTGTGCTTCTGTTTAACTCTTCGTAAGAACAGTGGTACG
265    TGTCTATATTTGGCTTTTGTAAAGCCAACAGTACATGCTTGCGTGGGTGAAAATGTGAAA
331    GCTGTGCTACAACCTTTTCGGCTCCCTCCTGCTTCGGTGTCTCCACATGCCCTGCACGG
397    AGAAATCCTAATGATTCAGCAGCACACCTGTCCGCTAGCCGCTACGCGTACACAGAAAAA
463    TTTTTGTCCACACACGCGCGCTCCGAGCCGAGATCCGAGCTAGCGCGGCGCATCCGAC
529    CGACAGCGCAGTGCCGTCTCCGCCGCCACCGCTTGGCGATTGTCCGCACCCACCAAGTCC
595    CTCCCCACGAGCGAAAACCACGGTCCACGGACCACGGCTATGTTCCACTCCAGGTGGAGG
661    GCCCCGGTTTCGCAAGCCGCGCCGTGGTTTGCTTGCCACAGGCGGCCAAACCGCACCCCTC
727    CGTCGTTTCCCATCTCTTCTCCTTTAGAGCTACCACTATATAAATCAGGGCTCATTCTCT
793    CTCACAGGCTCATCTCGCTTTGGATCGATTGGTTTCGTAAGTGGTGAGGGACTGAGGGTCT
859    TGGATTGATTGGGGATTCTGTTCGAAGATTTGCGGAGGGGGGCAATGGCGACCGCGGGGAAG
925    TCAAGTGCAAAGGTCGCCTTGTCTCCTCTGTCT

```

10. ábra. A kukorica *Adh1-F* gén promoter és open reading frame szakasza az UGM-F és az OAR primerekkel

```

CACCCACCAAGTCCACCACCTCCCCACGAGCGAAAACCACGGTCCACGGACCAC
GGCTATGTTCCACTCCAGGTGGAGGCTGCAGCCCCGGTTTCGCAAGCCGCGCCGT
GGTTTGCTTGCCACAGGCGGCCAAACCGCACCCCTCCTTCCCGTCGTTTCCCATCT
CTCCTCCTTTAGAGCTACCACTATATAAATCAGGGCTCATTCTCGCTCCTCAC
AGGCTCATCTCGCTTTGGATCGATTGGTTTCGTAAGTGGTGARGGACTGAGGGTCT
CGGAGTGGATCGATTTGGGATTCTGTTCGAAGATTTGCGGAG

```

11. ábra. A pollen specifikus expresszióban résztvevő **GGACTGA** motívum a +46 pozícióban, és azonos, ismétlődő szekvencia (**GGATCGA**) +19-nél és +65-nél.