

SZAKDOLGOZAT

Tóth Boglárka

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Növénytermesztési-tudományok Intézet

Mezőgazdasági mérnöki alapképzési szak

F2 KARFIOL POPULÁCIÓ MOLEKULÁRIS MARKEREZÉSE

Belső konzulens: Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kitti
egyetemi adjunktus

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** GBI, Genetika és Genomika
Tanszék

Készítette: Tóth Boglárka

Gödöllő

2024

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzés:	3
2. Szakirodalmi áttekintés:	4
2.1. Karfiol növény bemutatása:.....	4
2.2. Molekuláris markerezési technikák:.....	7
3. Anyag és Módszer	12
3.1. Növény-anyag bemutatása:	12
3.2. DNS izolációja és előkészítése:.....	16
3.3. PCR reakció SCoT markerrel:.....	17
3.4. SCAR marker fejlesztésre irányuló lépések:.....	19
3.5. AFLP marker használata:	24
4. Eredmények bemutatása:.....	28
4.1. SCoT marker használata:.....	28
4.2. AFLP markerezés:	33
5. Összefoglalás:.....	37
6. Irodalomjegyzék:.....	39
7. Táblázatok és ábrák jegyzéke:.....	42
8. Köszönetnyilvánítás:	44
9. Függelék:	45

1. Bevezetés és célkitűzés:

A karfiol, ahogyan a többi zöldségnövényre is jellemző, hogy egészséges és számunkra előnyös anyagokat tartalmaz. Ilyenek például a különböző vitaminok és egyéb ásványi anyagok.

Az utóbbi években rohamosan fejlődött a növénytermesztés és folyamatosan újabb fajtákat szeretnének, hogy a fogyasztói társadalmat minél jobban kielégíthessék. A nemesítők feladata nehezül, ugyanis a hagyományos, fenotípuson alapuló szelekciós módszerek, már nem elég gyorsak a mai változó világban. Az időigényesség mellett, olykor igen költségesek is, valamint bizonyos helyzetekben nem kivitelezhető az alkalmazásuk. Ugyanis vannak olyan tulajdonságok, amelyeknek fenotípusos megjelenése a környezeti tényezőktől függ, tehát nem ugyanúgy fog reagálni egy aszályos és egy esős évben az adott növény, ami elferdítheti a nemesítési eredményeket. Az általam vizsgált növény esetében, ilyen az érési idő, a növekedési erély és a fejminőség. Ha például a növény növekedése gyenge, akkor alacsony száraat hoz, amely a rózsasérüléséhez is vezethet, ezáltal eladhatatlanná válik a termelő számára és ha ez egy extrém esős évben szelektálták ki, a rá következő „normál” időjárási viszonyok közt, már nem teljesíti esetünkben a magas szárhosszt.

Három agronómialilag hasznos tulajdonság esetén végeztünk elemzést egy morfológiailag és fenológiailag nagy eltérést mutató két szülőtől származó szegregálódó F₂ karfiol populációban. A kijelölt tulajdonságok esetén, a fenotipizálási adatok birtokában, molekuláris vizsgálatot tűztünk ki célul. A hasadó populációból kiválasztott 6-6 szélső értéket mutató genotípusból egyedileg izolált DNS-t használva, a szélső értékeket reprezentáló F₂ „pool”-okat, azaz DNS keverékeket állítottunk elő. Ezt a hat szélső értékeket reprezentáló F₂ „pool”-t tizenhárom SCoT markerrel elemeztük a szülők mellett tizenegy referencia genotípussal kiegészítve. Emelet kettő F₂ pool-t és a szülőket AFLP markerrel is megvizsgáltuk (P1, P2, 507 fehér-kontrol, 517 fehér-kontrol, 9062 zöld-kontrol, 9064 zöld-kontrol, F₂ fehér-pool, F₂ zöld-pool). Polimorf fragmentum esetén a DNS szakasz pontos bázissorrendjének meghatározása után szekvencia specifikus marker fejlesztést tűztünk ki célul.

2. Szakirodalmi áttekintés:

2.1. Karfiol növény bemutatása:

A karfiol (*Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *botrytis*) a *Brassicales* (keresztesvirágúak) rend *Brassicaceae* (káposztafélék) családjába tartozó *Brassica* (káposzta) nemzetség tagja, amelynek termesztett formáját a legkésőbb kialakult káposztaféléként jegyzik. Hazánkban az első irodalmi utalást a karfiolra 1664-ben 'caulifioli' néven Lippay János művében olvashatjuk (Kristóf L. 2000). Génközpontja Olaszországban található (Crisp P. 1982). A karfiol számos egészségre előnyösen ható tulajdonsággal rendelkezik, ezért a világ több pontján az egészséges élelmiszerek közé sorolják (Manchali S. és munkatársai 2012). Lágy zamata és különleges textúrája sokoldalúvá teszi a főzési receptekben. Ezért a karfiol termesztésének és fogyasztásának népszerűsége az utóbbi években megugrott (<https://www.ers.usda.gov/>).

Őse a vadkáposzta, a *Brassica oleracea*, amelyből nemesítették a káposztafélék nemzetség tagjait (Nesbitt M. 2005). Azonban már 2500 évvel ezelőtt is fellelhető volt a mai karfiol őse Nagy-Britannia, Franciaország és a Mediterrán országok területein egyaránt. Már az ókori görögök és rómaiak is termesztették és a legjobb növények kiválasztásával tartották fent az állományokat. A tudatos szelekció megjelenésének hatására az 1600-as években már napjainkban megjelenő káposzta kinézetére nagyon hasonlító egyedeket termesztettek. A különböző kiválasztási nézetek, más-más megjelenést hoztak létre, mint a szár megnagyobbodása (karalábé), a virágzásiszervek megnyúlása (brokkoli és karfiol), vagy a sok apró fejre való törekvés (kelbimbó) (Stromberg J. 2015).

A karfiol zárvatermő, egyéves növény, fő és mellék gyökérzete van, ami a talaj felső hányadában található meg. Különleges ismertető jegye a torzsa csúcsán fejlődő félgömb alakú virágzati kezdemény, a rózsa. Fajtától függően a rózsa színe lehet hófehér, sárgás fehér, zöld, lila és narancssárga is. Tömege 0,4-3 kg között alakul. Jellegzetes hosszú, lapátszerű leveleket növeszt, amelyek körbe ölelik a rózsát. Szára 10-30 cm hosszú, de a növény magassága elérheti, akár az egy métert is (Kádár A. és munkatársai 1995). Virága a keresztesvirágúakra jellemzően két pár keresztben álló szirm- és csészelevelekből áll. Virágai sátorozó fürtvirágzatba rendeződnek, amelyet a rózsa teljes kifejlődése után hoz. Egy-egy virágzati száron több mint 100 virág is képződhet (Balázs S. 1994). Lentről fölfelé nyíló virágzása 20-50 napig is eltarthat. Rovarbeporzás

jellemzi. Termése fel nem nyíló száraz becő, amiben fekete vagy sötétbarna gömbölyű magok helyezkednek el. Csírázó képességük igen hosszú, akár 4-5 évig is tarthat, ezermagtömege 3-6 gramm (Terbe I. és munkatársai 2005).

Hazánkban őszi termesztésben van a karfiol. A termesztés sikerességét nemcsak a fajtaválasztás és a hozzátartozó technológiai lépések, hanem az időjárási tényezők is manipulálják. Például a közvetlen és erős napfény színelváltozást okozhat rózsája felületén, amellyel minősítik a növényt, ezzel nehezítve a termesztési feltételek megteremtését. A fajtákat tenyészidejük hosszával különböztetik meg egymástól. A korai termesztésűek rövidebb tenyészidővel rendelkeznek, mint a kései fajtáknak hosszabb időre van szükség a rózsá kifejlesztéséhez. Szabadföldi termesztés esetén fontos, hogy a levelek rózsá takaró képessége fejlett legyen, ugyanis elszíneződésük egyben minőségromlásuk a környezeti tényezőktől függenek (Terbe I. és munkatársai 2005). A tenyészidő alapján 4 csoportot különböztetünk meg: rövid (45-70 nap), középhosszú (70-90 nap), hosszú (90-130 nap) tenyészidejű fajtákat, illetve az áttelelő (150-270 nap) (Mártonffy B. 2001).

Egyedfejlődésének fázisaiban eltérő hőigénye van. Amíg palánta korban 12-16 lombleveles korig a 16°C feletti hőmérsékletet szereti, addig a későbbi időszakban 13-20°C közötti hőmérséklet az optimális. A rózsánövekedési szakaszban 25°C felett nagymértékben romlik a rózsák minősége. A vakítóan erős fény a rózsák sárgulását okozza. Viszont kevés fény esetén a tenyészidő hosszabbodik meg. Érdemes öntözésre alkalmas területen termesztetni, ugyanis kiegyensúlyozott fejlődéséhez elengedhetetlen az egyenletes vízellátás (Terbe I. és munkatársai 2005).

A termelőknek a fajta választásnál számos szempontot figyelembe kell venniük, ilyen például az alaktani és biológiai tulajdonságok, valamint a piaci és fogyasztói igényekkel szemben támasztott követelések. Alaktani tulajdonságok például a levelek egyedi tulajdonságai (rózsá takarási hajlamának erőssége) vagy a rózsák egyedi tulajdonságai (méret, forma, tömörttség). A biológiai tulajdonságok közé tartozik a növények genetikai teljesítőképességének színvonala, melyre különböző biotikus és abiotikus hatások is nyomást gyakorolnak. Karfiol növény esetén alapvető szempontjai például a fényérzékenység, hideg- és melegtűrő képesség, és a betegségekkel szembeni ellenállóság (Mártonffy B. 2001).

A karfiol gazdaságilag fontos fajtái általában fehér rózsával rendelkeznek. (Crisp, 1982). Azonban nemrégiben kialakuló spontán mutáció miatt kialakultak narancssárga, lila és zöld rózsá színű változatok (Crisp P. és munkatársai 1975; Crisp P. – Angell S. 1985). A rózsán megjelenő színek

nemcsak az esztétikai látványt növelik, hanem számos táplálkozási és egészségügyi értékkel járulnak hozzá a növény fontosságához. Például különböző vitaminok és antioxidánsok maga fokú termelésével (Li L. és munkatársai 2001; Chiu L. W. és munkatársai 2010). Az rózsza színe ezért fontos agronómiai tulajdonság. Továbbá a színes rózsákkal rendelkező karfiolok egyedülálló genetikai változatosságot biztosítanak a színképzés genetikai és molekuláris alapjainak megértéséhez (Huaqiang T. és munkatársai 2020).

A karfiol rózsában a narancssárga szín kialakulásáért egyetlen féldomináns génmutáció felel, amelyet végül Orange (Or) néven jelöltek meg (Crisp és munkatársai 1975). A gén a β -karotin termelését serkenti és a felhalmozódott anyag a fehér rózsát narancsra színezi (Li és munkatársai 2001). A karotinok zsírban oldódó provitaminok (a vitamin előanyaga), amelyek színét folyamatos konjugált kettős kötések okozzák. A karotinoidok mindig növényi eredetűek, és a táplálékon keresztül elérhetőek számunkra, mert a szervezetünk nem képes előállítani. A β -karotin az A-vitamin provitaminja (Schlieper C. A. 1992).

A lila rózsás karfiol mutánst szintén egyetlen féldomináns génmutáció okozta, amelyet Purple (Pr) néven jegyeztek fel. A Pr-gén az antociánok túltermeléséhez vezet, ami erős lila színt eredményez a rózsában és a környező szövetekben. A DNS-szakasz egy transzkripciós faktort kódol, amely antocián felhalmozódást idéz elő a sejtekben. (Chiu L. W. - Li L. 2012; Chiu és munkatársai 2010). Az antociánok a természetben előforduló pigmentek egy csoportja, amelyek több gyümölcs és zöldség piros-kék színét biztosítják. Az antociánok két szempontból is fontos anyag, nem csak az ipar használja természetes színezékként, hanem az emberi egészség területén is kiemelkedő szerepet töltenek be. Számtalan tudományos írás bizonyítja, hogy az antociánokban gazdag élelmiszerek fogyasztása révén csökkenhet a szív- és érrendszeri betegségek, a rák és más krónikus betegségek előfordulását. (Pascual-Teresa S. - Sanchez-Ballesta M. T. 2007)

A rózsában jelenlévő kloroplasztiszok eredményeként különböztetünk meg zöld rózsájú karfiolokat (Zhou és munkatársai 2011). Egyes kutatások szerint egy nem teljesen domináns gén felelős a zöld szín kialakításáért (Crisp és Angell 1985). A zöld és fehér rózsaszövetek korábbi vizsgálataiban arra utalnak, hogy az BoHY5 gén szerepet játszhat a kloroplasztiszok felszaporodásában (Zhou és munkatársai 2011). Azonban tényleges bizonyítékot még nem találtak, hogy a HY5 gén valóban zöldítő képességgel rendelkezik a fehér rózsza szövetekben. Ezért a fehér rózsza zölddé alakításáért felelős Green (Gr) gén továbbra is ismeretlen. A zöld rózsagén feltérképezése és azonosítása,

valamint a kapcsolódó molekuláris vizsgálatok nagy előrelépést jelentenének a zöld rózsafajták nemesítésében (Huaqiang T. és munkatársai 2020). Ugyanis termesztésének egyik fő előnye, hogy a hagyományos fehér karfiollal szemben a késő őszi termesztésben nagyobb termésbiztonságot biztosít állomány szinten, mert a zöld karfiolok esetén kisebb az esetlegesen kialakuló fagyok károsító hatása (Singh A. és munkatársai 1978).

2.2. Molekuláris markerezési technikák:

A növénynemesítés lényege, hogy a növény genetikai állományát átalakítja különböző módszerek segítségével, hogy az lehetőleg jobban megfeleljen az emberi igényeknek és agronómiai követelményeknek. Kezdetben a legjobb termések magjainak felfogása és újravetése, később a mendeli törvények szerinti szelekciót alkalmazták, amely sok időt emésztett fel a nemesítésben. Manapság a morfológiai és biológiai markerek lehetővé tették a folyamat felgyorsítását (Farooq S. – Azam F. 2002). A markereket a mennyiségi tulajdonságok összetett kérdéseinek részletes vizsgálatához használják. A molekuláris markerek, olyan kimutatható DNS-szakaszok, amelyek a genetikai változatosságot ábrázolják, lehetővé téve a különböző genotípusok közötti rokonságok kapcsolatának megismerését és annak előrejelzését, hogy mely párosítások hozhatnak létre új és jobb génkombinációkat, mert a markerek meglétét nem befolyásolják a különböző környezeti tényezők. (Paterson A. H. és munkatársai 1991; Pedryc A. 2008). Tehát a molekuláris markereket legtöbbször a szülők vagy hasadó populációk egyedeinek szelektálásához, QTL-térképezésre, valamint a fajták genetikai diverzitásának tanulmányozásához használják fel (Sleper D. A. 2006; Collard B. C. Y. és munkatársai 2005; Botha A. M. - Venter E. 2000; Dziechciarkova M. és munkatársai 2004; Gostimsky S. A. és munkatársai 2005; Gupta P. K. és munkatársai 1999; Kelly J. D. - Miklas P. N. 1998). A hagyományos QTL-térképezést gyakran használják a célgének azonosítására, amely során olyan specifikus markerhez jutunk, ami alapot biztosít a markerekkel támogatott szelekció elvégzéséhez (Salvi S. - Tuberosa R. 2005).

A molekuláris markerek jelentőségét a polimeráz láncreakciók, röviden PCR (Polymerase Chain Reaction) reakciók, során aknázták ki. Eredetileg a PCR-t a nyolcvanas években fejlesztették ki egy organizmus vagy génhiba DNS-ének vagy RNS-ének in vitro felerősítésére a gyógyászatban. Az RNS szál esetén, még a reakció megkezdése előtt, annak DNS-másolatát kell elkészíteni. A PCR elve egyszerű, három fő szakaszra osztható ciklikus folyamat: (1) a kettős DNS denaturálása, szétválasztása; 2) a primerek bekötése és 3) a primerek meghosszabítása. Egy ciklus általában 3-5

percig tart, és akár 20-40 alkalommal is ismételődhet. A PCR-reakció összetevői a puffer oldat (amely az enzimek számára előnyös környezetet alakít ki), nukleotidok, primerek, az DNS-polimeráz enzim és a vizsgált mintából származó nukleinsav keveréke. A denaturációs szakaszban számos fizikai és kémiai lehetőség van a DNS szétválasztására, de a 95-100 °C-ra történő melegítés a legegyszerűbb és leghatékonyabb. A bekötési folyamat során a primerek a szétválasztott DNS-szálakhoz kapcsolódnak. Mindegyik primer az eredeti DNS-szálak egyikéhez, a bal (5') vagy jobb (3') oldalához kapcsolódik. Miután a bekötés megtörtént, az enzim végzi az új DNS-szálak szintézisét. Az enzim egy DNS-polimeráz (sokszorosítóként funkcionál), amely a párosítatlan DNS-szálakhoz nukleotidokat kapcsol. A DNS-szálak száma minden ciklus végére megduplázódik. Egyetlen DNS-másolat 30 ciklus után akár 1 000 000 példányra is megnövekedhet, ami már szemmel láthatóan is kimutatható. A legelterjedtebb módszer az etídium-bromid (EtBr) festéssel agaróz gél-elektroforézis alkalmazása (Schochetman G. és munkatársai 1988).

Egy szelekciós eljárás lehet markerre alapozott (MAS), ennek előfeltétele, hogy az adott tulajdonsággal kapcsolt molekuláris marker azonosítását végrehajtsák (Barone A. 2004). A markereket három fő csoportba oszthatjuk. Vannak a morfológiai vagy klasszikus markerek, amelyek látható tulajdonságot jeleznek. A második csoport, a különböző enzimek allélvariánsai, amelyek közti különbséget elektroforézissel mutathatunk ki. A harmadik csoportot pedig a molekuláris markerek képezik, amelyek olyan DNS szakaszok, melyek pontos kromoszómális hellyel rendelkeznek a nem kódoló genomi régiókban (Collard és munkatársai 2005).

A kertészeti növények esetén számos molekuláris markert használnak: AFLP (amplified fragment length polymorphism), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence), SCAR (sequence characterized amplified region), SSR (simple sequence repeats), ISSR (Inter Simple Sequences), RAPD (random amplified polymorphic DNA), RFLP (restriction fragment length polymorphism), SCoT (start codon targeted). Az egyes markerezési technikák előnyeit és hátrányait az 1. táblázat foglalja össze (Agarwal M. és munkatársai, 2008; Collard B. C. Y. - Mackill D. J., 2009).

1. táblázat. Gyakran használt molekuláris markerezési technikák összehasonlítása (Forrás: Pedryc A. nyomán, 2008)

Marker rövidítése	Megismételhetőség esélye	Polimorfizmus mértéke	Műszaki feltételek költség szerint	Szükséges DNS-mennyiség	Fő alkalmazási területek
AFLP	nagy	közepes	közepes	közepes	Géntérképezés
CAPS	nagy	alacsony	nagy	kevés	Allélváltozékonyság kimutatása
SCAR	nagy	közepes	közepes	kevés	Gén- és fizikai térképezés
SSR	közepes	közepes	közepes	kevés	Genetikai diverzitás kutatása
RAPD	kismértékű	közepes	alacsony	kevés	Géntérképezés
RFLP	nagy	közepes	nagy	nagy	Fizikai térképezés

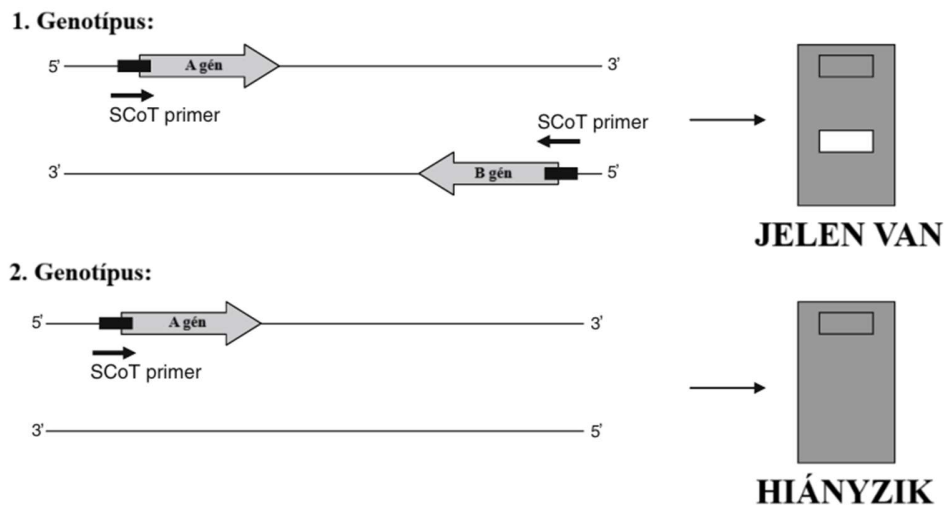
Az egyik legegyszerűbb PCR-en alapuló markerezési technikát RAPD-nak nevezik (Random Amplified Polymorphic DNA = véletlenszerűen felerősített polimorf DNS), amelyet Williams és munkatársai (1990), valamint teljesen függetlenül ugyanazon időszakban Welsh és McClelland (1990) fejlesztették ki. A módszer lényege, hogy a véletlenszerűen kiválasztott primerek a PCR-reakció során a primerszekvenciájával komplementer genomi régióhoz kapcsolódnak, amennyiben a primerek megtalálják a komplementer felület és egymással szemben helyezkednek el, akkor a primerek közötti DNS szakasz fog felszaporodni a PCR reakció lefutása során. A módszer fő előnye, hogy idő tekintetében gyorsan kivitelezhető. Azonban hátránya, hogy az eredmények nehezen reprodukálhatók, ismételhetők meg, ez egy egyszeri vizsgálati módszer, mert nem kapcsolódnak génterülethez, hanem véletlenszerűen választódnak ki a régiók. Valamint ezen módszer használatával csupán domináns gépeket lehet markerezési így a heterozigóta egyedek kiválogatására nem alkalmas (Cernák I. 2008). Az RAPD analízist is lehet más PCR-en alapuló markerezési technikával társítani. Ilyen például a Bulk Segregant Analysis-el (BSA) (Michelmores és munkatársai 1991) való együttes használata, ami monogén tulajdonságokhoz kapcsolt DNS

szakaszok azonosítására alkalmas (Jacobs J. M. E. és munkatársai 1996; Hosaka K. és munkatársai 2001).

A polimorfizmus reprodukálhatóságának növelése érdekében bevezethető a SCAR (Sequence Characterized Amplified Region = szekvenciával jellemzett amplifikált régió) markerrendszer (Lee JW. és munkatársai 2011). A SCAR-ok PCR-alapú markerek, amelyek egyetlen genetikailag meghatározott tulajdonságot képviselnek. Az RAPD vizsgálatok során kapott termékeket, DNS szakaszokat klónozzák, majd szekvenálják, tehát megállapítják az adott nukleotid sorrendjét. Az így kapott szekvenciára specifikus primerpárok tervezhetők, azaz SCAR markerré alakítható (Paran I. - Michelmores R.W. 1993). A felsokszorozni kívánt DNS-szakasz a genomban csak egy lókuszban kötődik és az ott jelenlévő markerallélok szaporítja fel. Az eljárással elérhetővé válik az adott DNS fragmentum célzott amplifikálására, felerősítésére. Ez már jól használható az adott tulajdonság követésére, amelyhez a markert kötöttük, annak szelekciójának elvégzésére (Cernák I. 2008).

Az elmúlt években számos új, alternatív és ígéretes markertechnika jelent meg. A genomikai kutatások gyors növekedésével párhuzamosan a tendencia eltávolodott a véletlenszerű DNS-markerektől a gén-célzott markerek felé. (Andersen J.R. - Lübberstedt T 2003; Gupta P. K. - Rustgi S. 2004). A. M. Gorji és munkatársai (2011) három molekuláris marker hatékonyságát vizsgálta: SCoT, ISSR és RAPD módszert. A kísérlet során kiderült, hogy a markerek hatékonysága viszonylag azonos volt. Azonban kimutatták, hogy a SCoT-analízis pontosabb értékeket ad.

Ugyanis a SCoT (Start Codon Targeted = célzott indító kodon) markerek reprodukálhatók. A SCoT markerek is, a RAPD markerekkel megegyezően, domináns markereket jeleznek, így a hasadó populációkban nem lehet megkülönböztetni a homozigóta domináns egyedet a heterozigóta egyedektől. A SCoT, ami egyetlen 18-mer primert használ és az ATG start kodont (Adezin-Timin-Guamin) körülvevő rövid, konzervált régióra specifikus. Abban az esetben, ha növényi genomban két gén fordított orientációban van jelen a DNS-szálon (1. ábra A és B gén) amplifikációs távon belül, akkor PCR terméket kapunk. A PCR reakcióban 50°C-os primer kötési hőmérsékletet használunk, majd agaróz gél elektroforézist végzünk festéssel. A szabványos felszereléssel rendelkező növénykutató laboratóriumok számára kiválóan alkalmazható módszer. Ezt az eljárást genotípusok genetikailag változatos készletével és egy visszakeresztett populációnak a felhasználásával hitelesítették. (Collard B. C. Y. - Mackill D. J. 2009).



1. ábra: A SCoT marker működési mechanizmusa (Collard B. C. Y. - Mackill D. J. 2009; forrás alapján)

Az AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism = amplifikált töredékhossz-polimorfizmus) marker technika a PCR-reakció és restrikciós enzimeken alapul a genomiális restrikciós fragmentumok kimutatására. A restrikciós enzim (vagy restrikciós endonukleáz enzim) képes azonosítani egy adott szekvenciát a kétszálú DNS-ben és ott elvágja a láncot. A folyamat során kétféle hasító enzimet használnak, egy gyakran hasítót, amely kis DNS-fragmentumokat hoz létre és egy ritkán hasítót (Vos P. és munkatársai 1995; Roberts R. J. – Murray K. 1976). Ennek a folyamatnak a kivitelezése nem igényel előzetes DNS-szekvencia ismeret, ezért lehetővé teszi bármilyen DNS-ről való ujjlenyomatok készítését, függetlenül annak származásától (Castro I. és munkatársai 2011). A módszer előnye, hogy kis mennyiségű DNS-t igényel és sok fragmentumot eredményez, valamint kiválóan reprodukálhatóak az eredmények. Azonban hátránya, hogy az azonosított markerek nagy része gyakran csoportokban vagy egy helyre tömörül. Továbbá bizonyos esetekben a primerek esetében különleges jelölőket kell használni (például izotópok), amelyek nagy mértékben drágítja a kísérlet kivitelezhetőségét (Livingstone K. D. és munkatársai 1999)

3. Anyag és Módszer

3.1. Növény-anyag bemutatása:

A térképezési populációban mindkét szülővonalat beltenyésztettek önmegporzás segítségével, hogy fix vonalakat hozzanak létre. A vonalak több tulajdonságban is eltérnek, amit az 2. táblázatban szemléltettem.

A P1-es szülővonal a 2000-es évek elejéről származtatható (Syngenta tulajdona), aminek szára rövid, rózsája fehér színű, közepesen mélyen talajhoz közel (általában 10 cm magason) helyezkedik el. A növények biomasszájának mértéke alacsony, tehát kis vigorral rendelkeznek, levelei rövidek és szélesek. Valamint rövid tenyészidejű, ugyanis ültetéstől számított 55. napon már szedhető és utána aránylag gyorsan, körülbelül 7-10 nap alatt indul virágzásnak. (2. ábra A és 2. táblázat)

A P2-es szülővonal (Syngenta tulajdona) 2014-ben lett nemesítve, hasonlóan a P1-es vonalhoz. A növények biomasszájának mértéke magas, tehát nagy vigorú, ennek megfelelően szára, levelei hosszúak, lándzsa alakúak. Rózsája zöld színű, és lapos. Középhosszú tenyészidejű, az ültetési időtől számítva nyári időszakban a 90-95. napon éri el a rózsza a megfelelő, már szedésre is alkalmas méretet. (2. ábra B és 2. táblázat)



2. ábra: **A**: P1-es szülő vonal; **B**: P2-es szülő vonal. (Syngenta, Ócsa)

2. táblázat: P1 és P2 szülő vonalak 3 tulajdonságának adatai, 3-3 egyed esetén. (Syngenta, Ócsa)

P1				P2		
egyed 1	egyed 2	egyed 3		egyed 1	egyed 2	egyed 3
62	62	62	Értékelés ideje (nap)	91	94	99
2	2	2	Rózsa színe (1: fehér 9: sötét zöld)	7	7	7
9	11,5	10,4	Szármagasság (cm)	34	24,5	15,5

A bemutatott két szülőtől származó F₂ hasadó populáció kialakítása már régebben megkezdődött. A jelen szakdolgozat egy 270 egyedből álló F₂ populáció egyes egyedeinek DNS-keverékeit vizsgálja. A fenotipizálási adatok alapján kiválasztottunk 3 tulajdonsági kategóriában 6-6 növényt: Rózsa színe (fehér ↔ zöld), növény magassága (alacsony ↔ magas), tenyészidő (korai ↔ kései). Az így meghatározott 36 egyedet (3. ábra és 3. táblázat) és a két szülőt elemeztük. Valamint további tizenegy referencia genotípussal kiegészülve végeztük el a vizsgálatokat, amelyeket kontrollként kezeltünk (4. táblázat).

3. táblázat: A kísérletbe vont 36 db F₂ egyed a 3-3-tulajdonságának megjelölésével. (Saját készítés)

zöld F ₂	F ₂ 108	F ₂ 177	F ₂ 240	F ₂ 246	F ₂ 256	F ₂ 287
fehér F ₂	F ₂ 17	F ₂ 39	F ₂ 53	F ₂ 117	F ₂ 159	F ₂ 167
korai F ₂	F ₂ 106	F ₂ 120	F ₂ 154	F ₂ 171	F ₂ 198	F ₂ 281
kései F ₂	F ₂ 20	F ₂ 63	F ₂ 137	F ₂ 214	F ₂ 203	F ₂ 233
alacsony F ₂	F ₂ 9	F ₂ 97	F ₂ 155	F ₂ 197	F ₂ 222	F ₂ 258
magas F ₂	F ₂ 27	F ₂ 37	F ₂ 201	F ₂ 225	F ₂ 234	F ₂ 240

4. táblázat: A molekuláris vizsgálatba bevont tételek nevei és három tulajdonságban fenotípusuk.
(Saját készítés)

Sorszáma	Neve	Tenyésztető hossza	Rózsa színe	Magasság
1	Fehér szülő 9075 karfiol	korai	fehér	alacsony
2	Zöld szülő 9074 karfiol	kései	zöld	magas
3	506 karfiol	korai	fehér	
4	507 karfiol		fehér	
5	512 karfiol			alacsony
6	514 karfiol			alacsony
7	516 karfiol	korai		
8	517 karfiol		fehér	
9	526 karfiol			alacsony
10	527 karfiol			alacsony
11	532 karfiol			magas
12	9062 karfiol	kései	zöld	
13	9064 karfiol	kései	zöld	
14	fehér pool F ₂		fehér	
15	zöld pool F ₂		zöld	
16	korai pool F ₂	korai		
17	kései pool F ₂	kései		
18	magas pool F ₂			magas
19	alacsony pool F ₂			alacsony



3. ábra: A kísérletbe vont 6-6 F_2 egyedek **A**-zöld; **B**-fehér; **C**-korai; **D**-késői; **E**-alacsony; **F**-magas.
(Syngenta, Ócsa)

3.2. DNS izolációja és előkészítése:

A növényeken levélmintázást hajtottunk végre és felhasználásig -72°C tároltunk. Ezt követően DNS-t izoláláltunk, azaz kivontuk a DNS-t a növényi sejtekből. A DNS kivonási folyamatot Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II. kit segítségével a leírás szerint végeztünk el, amelyet a függelékben egyes számú mellékletként csatoltam és a kísérlet során aszerint jártunk el.

DNS-pool-ok elkészítése:

A 6 tulajdonságnak megfelelően (fehér rózsza, zöld rózsza, magas szár, alacsony szár, korai, kései) DNS-pool-okat / DNS keverékeket hoztunk létre. Először a meglévő DNS-kivonatainkat egységes koncentrációjú oldattá hígítottuk, majd az oldatokból azonos mennyiségeket összemértünk, hogy különböző DNS-eket tartalmazó keverékeket kapjunk. Minden egyes DNS preparátumból azonos, **20 ng / µl** koncentrációjú hígítást használtunk.

A DNS hígítása:

A hígítási folyamatok megkezdése előtt NanoDrop spektrofotométer segítségével meghatároztuk a koncentrációkat.

A NanoDrop spektrofotométer használata és a hígítási eljárás:

1. A műszer mérőfelületének területét desztillált vízzel és papírtörölkendővel áttöröltük.
2. A gép rendszeréhez tartozó felületen a programot beállítottuk nukleinsav mérésére. [NUKLEINSAV] gomb.
3. A további műveletek között mindig áttöröltük papírtörölkendővel a mérési területet!!
4. A blank oldatból 2 µl-t tettünk a mérési területre → [BLANK] gomb (a műszer kalibrálása megtörtént) (blank = DNS nélküli puffer oldat)
5. Az ismeretlen koncentrációjú oldatból 2 µl-t helyeztünk a mérési területre → [MEASURE] gomb lenyomása után megkaptuk az oldatunk koncentrációját ng/ µl-ben.
6. Desztillált vízzel való áttörlés következett.
7. A már koncentráció ismeretében a szükséges oldat és a pótlendő víz mennyiségének kiszámításával folytattuk az alábbi képlet szerint:

$$C1 * V1 = C2 * V2 \Rightarrow \frac{C1 * V1}{C2} = V2$$

$$V1 - V2 = V_{\text{víz}}$$

C1 = amilyen végkoncentrációt szeretnék (esetünkben: 20 ng/ µl)

V1= amekkora végtérfogatot szeretnék (esetünkben: 50 µl)

C2 = az aktuális oldat lemerő koncentrációja (ng/ µl)

V2 = ismeretlen, a szükséges térfogat az aktuális DNS oldatból (µl)

Vvíz = ismeretlen, a pótlendő víz térfogata (µl)

8. Egy új csőbe a számításnak megfelelően a (V2) DNS törzsoldat és a víz (Vvíz) bemérése történt meg.

3.3. PCR reakció SCoT markerrel:

PCR-t (Polymerase Chain Reaction), polimeráz láncreakciót, hajtottunk végre, hogy a DNS lánc szakaszát főlzaporítsuk a már szemmel is kimutatható tartományba. A PCR reakció 10 µl végtérfogatban tartalmaz 2 µl hígított DNS-t és 8 µl Master Mix-et.

A Master Mix összerakásának folyamata:

1. A táblázat segítségével kiszámoltuk, hogy az egyes összetevőkből mennyire lesz szükséges. (5. táblázat).
2. „X” + 1 minta= „Y”; az X a minták db számát jelöli; a mi esetünkben 19 db minta van, plusz 1 minta, ami csak vizet tartalmaz, így íz X=20 és az Y=21.
3. Az alkotórészek összemérését követően vortex segítségével rázattuk az elegyet.
4. A Master Mix elkészült, felhasználásig jégben kell tárolni, hűteni szükséges.

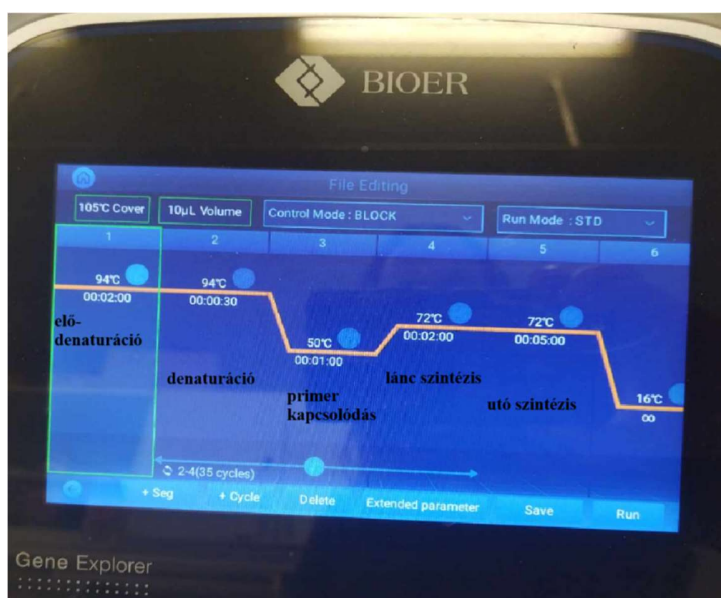
5. táblázat: SCoT primer (6. táblázat) Master Mix összetevőinek listája és kiszámításának segédletével (Saját készítés)

Master Mix elemei	1 minta (8 µl)	„X” + 1 minta = „Y”
primer SCoT	1,5	„Y” * 0,75
puffer	1	„Y” * 1
dNTP (2 mM)	1	„Y” * 1
MgCl ₂ (25 mM)	0,2	„Y” * 0,2
víz (desztillált)	4,3	„Y” * 4,3
enzim (dream Taq; Thermo Fisher Scientific)	0,05	„Y” * 0,05

Ezután a PCR-csövek előkészítését végeztük el. Miután elláttuk őket a megfelelő számokkal 2-2 µl hígított DNS-t és 8-8 µl Master Mix-et tettünk bele. Aztán a BIOER PCR gépben beállítottunk egy 50°C-os primer kapcsolódási hőmérsékletet tartalmazó protokollt, aminek a lépéseit a 4. ábra mutatja be.

6. táblázat: A kísérletben használt SCoT primerek és szekvenciájuk (Saját készítés)

Kód	Primer	Szekvencia	Hőmérséklet
a	SCoT 1	5'- CAA CAA TGG CTA CCA CCA- 3'	52,6°C
b	SCoT 3	5'- CAA CAA TGG CTA CCA CCG- 3'	53,9°C
c	SCoT 12	5'- ACG ACA TGG CGA CCA ACG- 3'	58,4°C
d	SCoT 13	5'- ACG ACA TGG CGA CCA TCG- 3'	58,0°C
e	SCoT 15	5'- ACG ACA TGG CGA CCG CGA- 3'	62,6°C
f	SCoT 18	5'- ACC ATG GCT ACC ACC GCC- 3'	60,7°C
g	SCoT 19	5'- ACC ATG GCT ACC ACC GGC- 3'	60,7°C
i	SCoT 22	5'- AAC CAT GGC TAC CAC CAC- 3'	55,0°C
j	SCoT 29	5'- CCA TGG CTA CCA CCG GCC- 3'	61,7°C
k	SCoT 30	5'- CCA TGG CTA CCA CCG GCG- 3'	61,8°C
l	SCoT 31	5'- CCA TGG CTA CCA CCG CCT- 3'	60,4°C
m	SCoT 33	5'- CCA TGG CTA CCA CCG CAG- 3'	58,9°C
n	SCoT 34	5'- ACC ATG GCT ACC ACC GCA- 3'	59,7°C



4. ábra: SCoT primer PCR protokoll (Saját felvétel)

Agaróz gélöntése és a PCR termék elválasztása:

1,5%-os agaróz gélöntésének menete:

1. Kimértünk 120 ml 0,5xTBE (tris-bórsav és EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) vizes oldata) és 1,8 g agaróz port.
2. Mikró segítségével fölmelegítettük az elegyet és néha meglögyböltük. A melegítést addig folytattuk míg a szemcsék el nem tűntek.
3. Csapnál folyóvíz alatt, folyamatos mozzgatás mellett, kézmelegre hűtöttük.
4. 2 µl EtBr (Etídium-Bromid) bemérése az oldatba.
5. A gél kiöntöttük a formába és egy 20 zsebet kialakító fésűt tettünk bele.
6. 10-15 perces szilárdulás követően felhasználható a gél.

A várakozási idő letelte után óvatosan egy határozott mozzdulat segítségével eltávolítottuk a fésűt a gélből. Az agaróz gél elektroforézisre alkalmas kádba behelyeztük a tálcát és feltöltöttük a 0,5xTBE puffer oldatot a maximumig, hogy ellepje a gélünket. Az agarózgélbe képzett zsebekbe belepipetáztuk a 10 µl térfogatú PCR terméket és elindítottuk a futtatási programot, ami 90V feszültséget jelentett 2 órán keresztül. 40 perc elteltével lefotóztuk a gél és a fennmaradó idő eltelte után újabb képet készítettünk.

Az elválasztott DNS szakaszok dokumentálására az Alpha Innotech Multimage™ Light Cabinet gél-dokumentációs készüléket használtuk. Lényege, hogy UV megvilágítással gerjeszti a gélbe juttatott és a futtatás során a DNS szakaszokhoz kapcsolódott festékanyagot és számunkra is jól láthatóvá teszi a gélen. A [EXPOSE] és a [FREEZE] gombok lenyomásával képet rögzítettünk róla. A szoftverében lévő fekete, fehér és gamma szűrőket használva beállítottuk, hogy a sávok szépen kirajzolódjanak.

3.4. SCAR marker fejlesztésre irányuló lépések:

Az eredmények vizsgálatát követően megjelöltünk bizonyos band-eket, amelyek polimorf tulajdonságokat mutattak.

A kívánt DNS szakaszokat kinyertük az agaróz gélből, aminek során steril szikével dolgoztunk, amit vágásonként alkohollal áttöröltünk. A folyamat végén a kivágott gél szeletet egy steril mikrocentrifuga csőbe helyeztük. Ezt követően a Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR

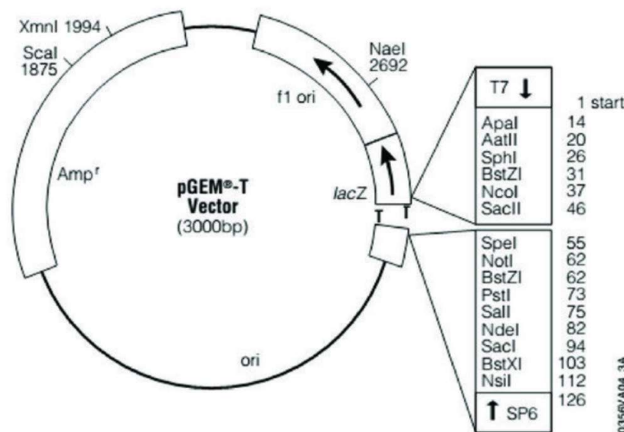
Clean-up kit protokolljának leírása szerint cselekedtünk, amelyet a függelékben kettes számú mellékletként csatoltam. A kísérlet során végig a protokoll szerint jártunk el.

A kinyert mintákat ötvenszeresre hígítottuk, majd re-PCR-rel ellenőriztük őket, azaz újra végig csináltuk a PCR kísérletet rajtuk, hogy bebizonyítsuk, hogy a DNS szakaszok kivágása és tisztítása sikeres volt.

Ugyanazon lépéseket tettük meg, mint amit már korábban részleteztem a 3.3.-as pontban a „PCR reakció SCoT markerrel” című fejezetben. Természetesen más számokat és mennyiségeket alkalmaztunk a képletnek megfelelően, de az alkalmazott SCoT primerek megegyeztek az első PCR-ben is használtakkal.

A jobb eredmények érdekében agaróz gélből ismét kivágtuk az immáron nagyobb koncentrációjú DNS szakaszainkat, amelynek folyamatát a függelékben a kettes számú melléklet protokollja tartalmaz.

Következő lépésként az ismeretlen szekvenciával rendelkező DNS szakasz plazmidba történő ligálása / bejuttatása volt, amihez pGemT-Easy plazmidot (5. ábra) használtunk. A kísérlet során steril fülkében steril eszközökkel dolgoztunk.



5. ábra: A pGemT-Easy plazmid térképe (Promega)

A ligálás menete:

1. 1 µl ligáz enzimet, 5 µl puffert, 1 µl pGemT-Easy plazmidot és 0,5 µl desztilláltvizet elegyítettünk.
2. majd 2,5 µl PCR terméket pipetáztunk bele,

3. A 10 µl végtérfogatú keveréket 23 °C-on inkubáltuk egy órán át, majd egy éjszakán keresztül 4 °C-on tartottuk.

A kompetens sejtekbe transzformáltuk a plazmidot. A folyamat során steril fülkében, steril eszközökkel dolgoztunk. LB táptalajt készítettünk a baktérium sejtek számára, folyékony táptalaj esetén agar nélkül, szilárd táptalaj esetén agar hozzáadásával (1 literre számolva, 7-es pH-n: 10 g tripton; 5 g élesztő; 10 g NaCl; 12 g agar).

Transzformációs Protokoll:

1. A transzformációban résztvevő *E. coli* DH5 sejteket jégen kiolvastottuk és 50 µl-t pipettáztunk egy steril Eppendorf-csőbe.
2. 3 µl ligált terméket adtunk a sejtekhez és 20 percig jégen inkubáltuk.
3. Az elegyet 50 másodpercig 42 °C-os vízben tartottuk.
4. 2 percig jégen inkubáltuk a sejteket.
5. 950 µl folyékony LB táptalajt adtunk a csövekbe, és 1,5 órán 37 °C-on rázattuk.
6. Az elegyet maximális sebességet használva centrifugáltuk 5 percig.
7. A fölülúszó 950 µl LB táptalajt eltávolítottuk, majd a sejteket a maradék 50 µl-t felfuszpendáltuk.
8. A sejtszuszpenziókat ampicillin (100 mg / ml) antibiotikumot tartalmazó szilárd 0,1 M IPTG / 50 mg / ml X-Gal LB táptalajon petricsészében oszlattuk szét, és egy éjszakán keresztül 37 °C-on tartottuk.

Másnap a petricsészékben lévő táptalajokat (5. ábra) megnéztük, hogy vannak-e rajta kolóniák. Amennyiben igen, a fehér telepekből MasterPlate-et készítettünk (azonban, ha kevés fehér kolónia volt a plétünkben, abban az esetben a kék színű kolóniákból is használtunk fel a kísérlethez). Ahány kolóniánk volt, de minimum 8-at steril pipetta hegygel felvettünk, és tovább vittük a MasterPlate-re.

Ezt követően előre számozott PCR csőbe (ami a Master Platen az 1-es az a PCR esetén is az 1-es és így tovább) 10 µl steril vizet mértünk és azzal a hegygel, amivel a kolóniát felvettem és húztam egy vonalat az 1-es szám mellé a pléten, azt az 1-es PCR csőbe dobtuk (ez lesz a kolónia PCR esetén a tempát). A MasterPlate-et 37 °C-on inkubáltuk. A PCR csöveket a hegyek eltávolítása után

95 °C-on 10 percig tartottuk őket, hogy a sejtek széteszenek és kiszabaduljanak a sejtrészek és velük együtt a plazmid DNS is, ami a PCR reakcióban templátként fog szolgálni.

Az M13 primer párt (7.táblázat) használtuk a PCR reakcióban, ami a plazmid szekvenciájára specifikus. Ez lesz a kolónia PCR esetén a vizsgált DNS. Ugyan azon lépéseket tettük meg, mint amit már korábban részleteztem a 3.3.-as pontban a „PCR reakció SCoT markerrel” című fejezetben. Természetesen más számokat és mennyiségeket alkalmaztunk a képletnek megfelelően és más PCR protokollt használtunk hozzá. (8. és 9. táblázat)

7. táblázat: M13 primer pár szekvenciája (Saját készítés)

Primer típusa	szekvencia
M13 Forward	5'CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'
M13 Reverse	5'TCACACAGGAAACAGCTATGAC3'

8. táblázat: Kolónia PCR Master Mix összetevőinek listája és kiszámításának segédlete (Saját készítés)

Master Mix elemei	1 minta (8 µl)	„X” + 1 minta = „Y”
primer M13F	0,75	„Y” * 0,75
primer M13R	0,75	„Y” * 0,75
puffer	1	„Y” * 1
dNTP (4 mM)	1	„Y” * 1
MgCl ₂ (25 mM)	0,2	„Y” * 0,2
víz (desztillált)	4,3	„Y” * 4,3
enzim (dream Taq; Thermo Fisher Scientific)	0,05	„Y” * 0,05

9. táblázat: Kolónia PCR protokoll (Saját készítés)

Lépés	Hőmérséklet (°C)	Idő (perc)
1.(denaturáció)	94	3
2.(denaturáció)	94	0,5
3.(primer kapcsolódás)	58	1
4.(lánc szintézis)	72	1
5.(utó szintézis)	72	5
6.	16	∞

A szürkével jelölt sávot 35-ször ismételni ciklus szerűen.

Egy százalékos agaróz gélét öntöttünk, amit 90V-on 30 percig futtattuk.

A gékép elkészítése után dokumentáltuk az adatokat a kiértékeléshez.

Ezután a kolónia PCR eredményeit felhasználva a pozitív telepekből plazmid izolálás céljából folyékony tenyészeteket készítettünk. Először 5 ml folyékony LB táptalajt steril Erlenmeyer lombikba pipettáztunk, majd a félretett MasterPlate-ről a megfelelő számú kihúzott sejtekből steril fogpiszkáló segítségével beoltottuk az oldatot. 37 °C-on egy éjszakán keresztül ráztattuk, hogy megfelelőképpen felszaporodjanak a sejtek a folyadékban. Rákövetkező nap plazmidot izoláltunk a mintákból.

A plazmid izolálást Macherey-Nagel NucleoSpin Plazmid EasyPur kit segítségével végeztük el, amelyet a függelékben hármas számú mellékletként csatoltam. A folyamat elvégzése közben nem tértünk el a protokolltól. NanoDrop spektrofotométer segítségével meghatároztuk a plazmid DNS koncentrációját.

A szekvenálásra való elküldés előtt megbizonyosodtunk arról, hogy kivágható-e a kívánt méretű insert a plazmidból emésztéssel.

Plazmid emésztésének protokolja:

A plazmid emésztését az EcoRI restrikciós enzim segítségével végeztük el annak megállapítására, hogy a plazmid tartalmazza-e a megfelelő méretű inszertet, amit a 10. táblázatban szereplő komponensek felhasználásával végeztünk.

10. táblázat: A plazmid emésztéshez használt összetevők és mennyiségek. (Saját készítés)

Összetevők	Térfogat (µl)
10x puffer EcoRI (Thermo Fisher Scientific)	2
EcoRI enzim (Thermo Fisher Scientific)	1
plazmid	5
víz	12

Az emésztési mixet 37 ° C-on 2 órán keresztül inkubáltuk, majd 1%-os agaróz gél öntése után 90V-on, 30 percig futtattuk.

A kísérlet lezárásaként DNS-szekvenálásra küldtük a plazmid DNS-eket M13 reverse / forward primerrel.

3.5. AFLP marker használata:

A korábban bemutatott növényanyagot hat genotípusra és két pool-ra szűkítettük ((1) P1 fehér-szülő, (2) P2 zöld-szülő, (4) 507 fehér-kontrol, (8) 517 fehér-kontrol, (12) 9062 zöld-kontrol, (13) 9064 zöld-kontrol, (14) F₂ fehér-pool, (15) F₂ zöld-pool (4. táblázat)). A kísérletben a DNS izolálást követően (3.1. pont) AFLP elemzést hajtottunk végre, amelyet öt fő pontban részleteznék.

1. **Emésztés:** A 11. táblázatban listázott összetevőket egy csőbe mértük, kivéve az EcoRI enzimet és néhány másodperces centrifugálást követően egy éjszakán át 65 °C-on inkubáltuk PCR gépben. Másnap a meghatározott térfogatú EcoRI enzimet is hozzá mértük, majd egy éjszakán keresztül 37 °C-on tartottuk. Egy százalékos agaróz gélen teszteltük sikerességét.

11. táblázat: Emésztési mixhez használt hozzávalók listája (Saját készítés)

Összetevők	Térfogat (μl)
Tango puffer 10X (thermo fisher)	4
MseI enzim	0.5
EcoRI enzim	0.5
nukleázmentes víz	5.5
DNS-izolátum	10

2. **Az adapter ligálása:** Az adapter ligálásához (13. táblázat) 10 μl emésztett DNS-t és a 12. táblázatban összefoglalt komponenseket használtuk a megadott térfogatmennyiségben. A kapott elegyet néhány másodpercig centrifugáltuk, majd 23 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. Az idő letelte után 4 °C-on tartottuk egy éjszakán keresztül.

12. táblázat: Az adapter ligálásához használt összetevők. (Saját készítés)

Összetevők	Térfogat (μl)
Puffer (10X)	4
EcoRI-F adapter	0.5
EcoRI-R adapter	0.5
MseI- F adapter	0.5
MseI-R adapter	0.5
T4 DNS ligáz	1
Víz	3

13. táblázat: A felhasznált adapterek szekvenciái. (Saját készítés)

Név	Szekvencia
EcoRI-R adapter	5'AATTGGTACGCAGTC 3'
EcoRI-F adapter	3'CCATGCGAGTCAGATGCTC 5'
MseI- R adapter	3'GACGATGAGTCCTGAG 5'
MseI-F adapter	5'TACTCAGGACTCATC3'

- 3. Preszelektív PCR:** Az előző lépés terméknek 4 μl-jét használtuk templátként a PCR reakcióban a 14. táblázatban látható primer szekvenciákkal. A Master Mix összeállítása a hasonlóan történ, mint a kolónia PCR esetén, csak 20 μl-es végtérfogatra kalkulálva (15. táblázat). A primer tapadási szakaszban a hőmérséklet 65°C-on történt 30 másodpercig. Az így kapott PCR termékeket 2 μl etidium-bromiddal (EtBr) festett 1%-os agaróz gélen ellenőriztük a 3.3. pontban részletezett eljárást követve.

14. táblázat: Az AFLP preszelektív PCR során használt szekvenciák. (Saját készítés)

Primer	Szekvencia
EcoRI- preszelektív primer	5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
MseI- preszelektív primer	5' GATGAGTCCTGAGTAA 3'

15. táblázat: AFLP preszelektív PCR Master Mix összetevőinek listája és kiszámításának segédlete. (Saját készítés)

Master Mix elemei	1 minta (16 µl)	„X” + 1 minta = „Y”
primerF- preszelektív primer	1,5	„Y” * 1,5
primerR- preszelektív primer	1,5	„Y” * 1,5
puffer	2	„Y” * 2
dNTP (4 mM)	2	„Y” * 2
MgCl ₂ (25 mM)	0,4	„Y” * 0,4
víz (desztillált)	8,6	„Y” * 8,6
enzim (dream Taq; Thermo Fisher Scientific)	0,1	„Y” * 0,1

4. **Szelektív PCR:** A preszelektív PCR terméket 50-szeres koncentrációra hígítottuk, tehát 1 µl preszelektív PCR terméket 49 µl vízzel hígítottunk. A szelektív PCR-hez 4 µl hígított mintát használtunk. Összesen 8 primer kombináció (16. táblázat) vett részt a kísérletben, amelyek ugyanazokból a szekvenciákból álltak, mint a fenti 14. táblázatban említettek (EcoRI, MseI), kivéve, hogy 3 további nukleotidot tartalmaznak a 3' végüknél. A 15. táblázatban felsorolt összetevők felhasználásával készült a Master Mix (a preszelektív primerek helyet, már a szelektív primereket alkalmaztuk). A 3.3. pontban részletezett leírást használva végeztük el a PCR reakciót. A primer tapadási szakaszban a hőmérséklet 65°C-on történt 30 másodpercig. A kapott PCR-terméket 2 µl etidium-bromiddal festett 1% agarózon ellenőriztük, hogy megfelelően jártunk el és a sikeres eredmények esetén poliakrilamid (17. táblázat) gélelektroforézist végeztünk el 110 V-on 16 óráig (délután négytől reggel nyolcig) 4°C-os szobában. PCR gépben 94°C-on hat percig inkubáltuk a 4 µl futtató puffer és 6 µl szelektív PCR-ből álló elegyet. A gélbe való bevitelig jégen tartottuk. A géllöntést követően 23 zsebes fésűt helyeztünk a megragasztott kazettába. Miután a futás véget ért, ezüstfestéssel tettük láthatóvá a gélen az eredményeket.

16. táblázat: A szelektív PCR-hez használt szelektív primerek kombinációi. (Saját készítés)

kombináció sorszáma	szelektív EcoRI primer 3' vége	szelektív MseI primer 3' vége
I.	ATC-3'	CTC-3'
II.	ACC-3'	CTC-3'
III.	AGC-3'	CTC-3'
IV.	ATC-3'	CAC-3'
V.	ACC-3'	CAC-3'
VI.	ATC-3'	CTG-3'
VII.	AGC-3'	CTG-3'
VIII.	ACC-3'	CTG-3'

17. táblázat: 8%-os poliakrilamid gél összetevőinek listája. (Saját készítés)

Összetevők	Térfogat
AA 40%	6 (ml)
BA 2%	3 (ml)
10xTBE	1,5 (ml)
TEMED	65 (μl)
APS 10%	155 (μl)
víz	24,5 (ml)

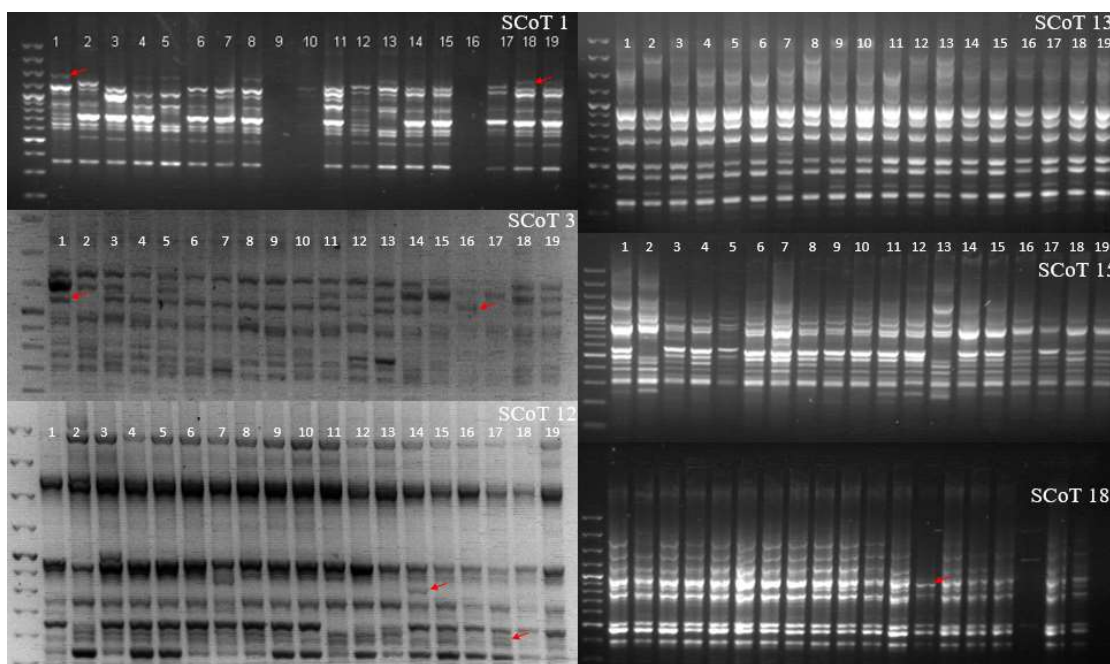
5. **Ezüstfestés:** A poliakrilamid gél ezüst festését a következő eljárással hajtottuk végre:

- A gél ultratiszta vízzel mostuk.
- 200 ml ultratiszta víz és 3 ml 65%-os HNO₃ felhasználásával készített első oldatban 5 percig stabilizáltuk a DNS fragmentumokat a gélben.
- A gél 2 alkalommal ultratiszta vízzel mostuk, majd 25-30 percig festettük a kettes oldattal, amelyet 0,4 g AgNO₃ és 200 ml ultratiszta víz felhasználásával készítettünk el.
- A gél kétszer mostuk ultratiszta vízzel, majd a gél 10-15 percig előhívó-oldatban áztattuk (az előhívó-oldat: 200 ml ultratiszta vízben 12 g Na₂CO₃ feloldottunk, majd 70 μl 30%-os HCOH-t adtunk hozzá).
- A gél kétszer ultratiszta vízzel mostuk.
- A negyedik oldatban 5 percig fixáltuk a gél. A negyedik oldat 200 ml ultratiszta víz és 62,5 ml 96%-os CH₃COOH keverésével készítettük el.
- A gél kétszer mostuk ultratiszta vízzel.
- A gél 10-15 percig áztattuk az ötödik oldatban. Az ötödik oldatot 200 ml ultratiszta víz és 69 ml 87%-os glicerin összekeverésével hoztunk létre.
- Végül a gél kétszer mostuk ultratiszta vízzel, majd hagytuk megszáradni két celofán közé helyezve és egy keretre feszítve, mielőtt a kiértékelést megkezdjük volna.

4. Eredmények bemutatása:

4.1. SCoT marker használata:

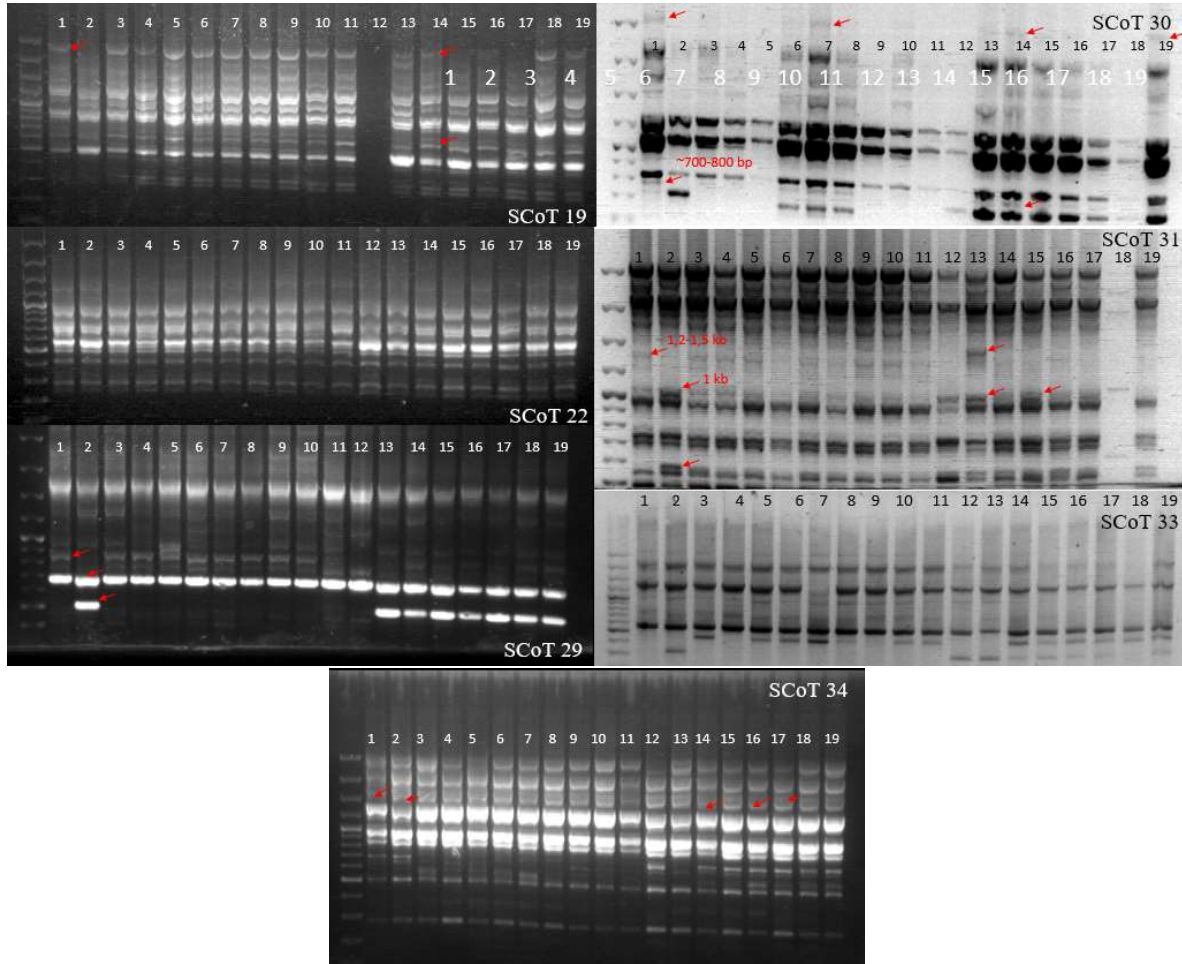
A PCR reakciókat tizenhárom különböző SCoT primerrel (6. táblázat) végeztük el, aminek növény anyagát a F₂ populációból kialakított 6 db F₂ pool (a kijelölt három tulajdonság szélsőértéki), a P1 és P2-es szülő biztosította a tizenegy referencia genotípus mellett (4. táblázat). Ezek eredményeit a 6. és 7. ábra szemlélteti. A piros nyilak mutatnak a valószínűsített polimorf fragmentumokra.



6. ábra: Hat SCoT marker eredménye 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1.: Fehér szülő 9075; 2.: Zöld szülő 9074; 3.: 506; 4.: 507; 5.: 512; 6.: 514; 7.: 516; 8.: 517; 9.: 526; 10.: 527; 11.: 532; 12.: 9062; 13.: 9064; 14.: F₂ fehér pool; 15.: F₂ zöld pool; 16.: F₂ korai pool; 17.: F₂ kései pool; 18.: F₂ magas pool; 19.: F₂ alacsony pool (Saját felvétel)

Kutatásunk célja polimorf DNS szakasz azonosítása volt, azaz az egyik szélső értéket jelentő fenotípusos kategóriában megjelenik a sáv vagy fragmentum, míg a vele ellentétes kategóriában nem lesz látható. Például a zöld, illetve az ennek megfelelő a P2-es zöld-szülőben is megjelenik, de a másikonban (fehér-pool, P1-es fehér-szülő) hiányzik, vagy fordítva. A 6. ábrán a látható például: **SCoT3**: 1 és 16 minta a korai fenotípusra jellemző DNS-szakaszt jelöli valószínűleg (nyíl szerint 1-1,2 kb), minden más koraiban is benne van (3, 7 minta), ellenben a 2 (kései szülő) 12 (kései kontroll) 17 (kései pool) nem tartalmazza, polimorf fragmentumnak mondható; **SCoT12**: 14-es mintában jelen van egyedülként egy DNS szakasz (800 bp), ami a többiből hiányzik. Ezt további

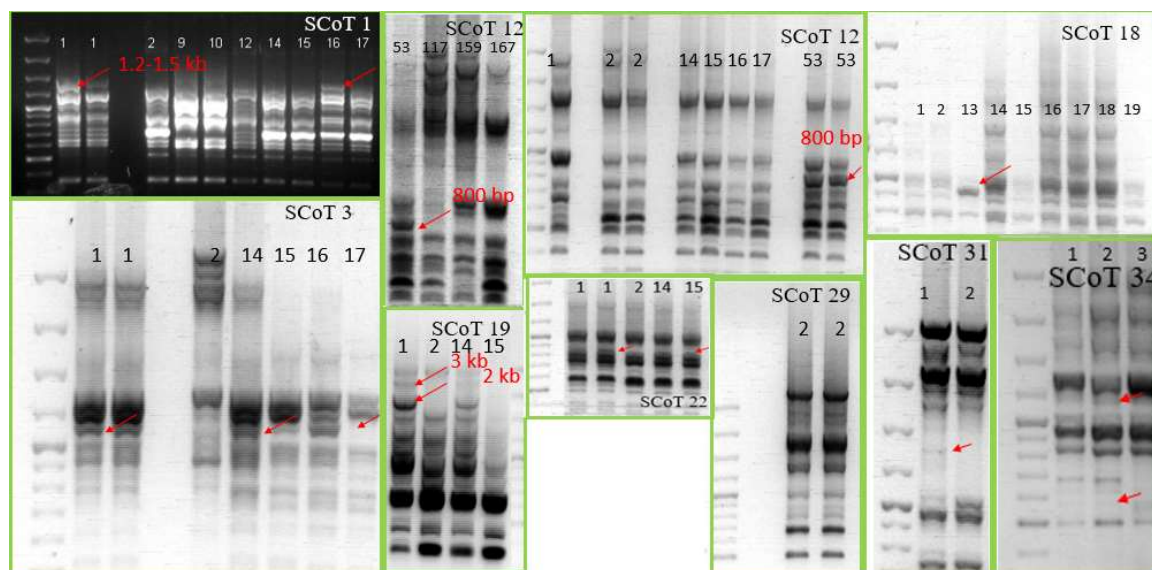
vizsgálatokat igényelt, így felbontottuk az említett fehér F₂ pool-t az eredeti hat genotípusra, hogy meghatározzuk, hogy melyik tartalmazza.



7. ábra: Hét SCoT marker eredménye 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemlélítve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1.: Fehér szülő 9075; 2.: Zöld szülő 9074; 3.: 506; 4.: 507; 5.: 512; 6.: 514; 7.: F₂516; 8.: 517; 9.: 526; 10.: 527; 11.: 532; 12.: 9062; 13.: 9064; 14.: F₂ fehér pool; 15.: F₂ zöld pool; 16.: F₂ korai pool; 17.: F₂ kései pool; 18.: F₂ magas pool; 19.: F₂ alacsony pool (Forrás: Saját felvétel)

A 7. ábrán a látható például: **SCoT19**: 14 (fehér pool) egyezést mutat 1 (fehér szülő) 3, 4, 8 (fehér) kontrollok is megerősítik ezt (2-3 kb). Azonban a 15. mintából (zöld pool) ez a szakasz hiányzik, úgy, mint a 2 (zöld szülő) és a 13 (zöld) kontrolban, azaz polimorf fragmentumnak mondható.

Azokat a PCR-reakciókat, amiket piros nyíllal megjelöltünk, azaz különbségeket véltünk felfedezni, azokat egy csökkentett mintaszámmal újra PCR-eztük, hogy megvizsgáljuk valóban polimorfok-e. Az eredményeket a 8. ábrán mutatom be.

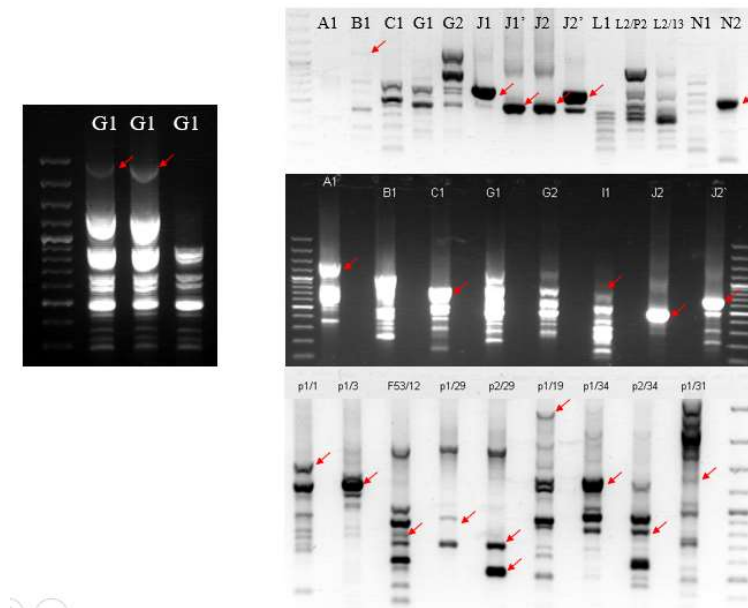


8. ábra: Kilenc SCoT marker ellenőrzésének eredménye 1,5%-os EtBr festett agaróz gélben szemlélítve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1.: Fehér szülő 9075; 2.: Zöld szülő 9074; 3.: 506; 9.: 526; 10.: 527; 12.: 9062; 13.: 9064; 14.: F₂ fehér pool; 15.: F₂ zöld pool; 16.: F₂ korai pool; 17.: F₂ kései pool; 18.: F₂ magas pool; 19.: F₂ alacsony pool; *SCoT12 esetén a felbontott pool-ból látható 4 egyed (3. táblázat) (Saját felvétel)

Abban az esetben, amennyiben a 8. ábrán látható eredmények megegyeztek a 6. és 7. ábrán láthatókkal, akkor azt a DNS-sávot kivágtuk az agaróz gélből (18. táblázat) és re-PCR-rel ellenőriztük (9. ábra) a kivágás sikerességét.

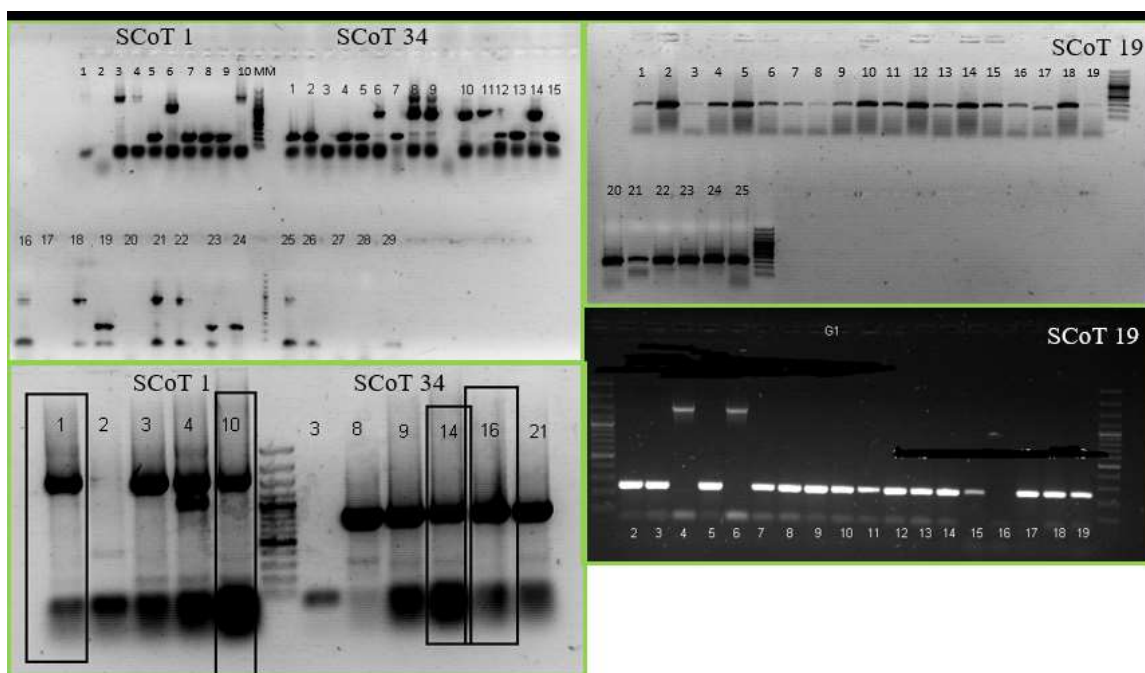
18. táblázat: A gélből kivágott fragmentumok listája és eredménye a re-PCR-ben. (Saját készítés)

templát (DNS-minta)	primer kód	primer név	becsült méret	koncentráció	re PCR mutatja a fragmentumot	Ligálásra kiválasztva
P1	a	SCoT1	1,2-1,5 kb	9,52	igen	OK
P1	b	SCoT 3	1,2 kb	8,23	igen	-
F2 53	c	SCoT 12	800 bp	10,07	igen	-
P1	g	SCoT 19	2,5 kb	6,31	igen	OK
P1	g	SCoT 19	2 kb	5,86	igen	-
P1	i	SCoT 22	800 bp	7,47	igen	-
P1	j	SCoT 29	800 bp	9,12	igen	-
P2	j	SCoT 29	700 bp	7,54	igen	-
P2	j	SCoT 29	500 bp	11,28	igen	-
P1	l	SCoT 31	1,2- 1,5 kb	7,55	igen	-
P2	n	SCoT 34	700 bp	26,55	igen	OK
P1	n	SCoT 34	1,2 kb	7,19	igen	-

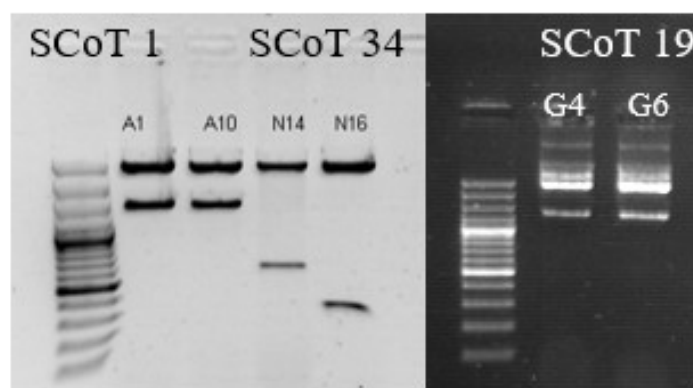


9. ábra: a re-PCR eredményei 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemlélítve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: A1-SCoT1 és P1 Fehér szülő 9075; B1-SCoT3 és P1 Fehér szülő 9075; C1-SCoT12 és F₂53; G1-SCoT19 és P1 Fehér szülő 9075 (2,5 kb); G2-SCoT19 P1 Fehér szülő 9075 (2 kb); J1-SCoT29 és P1 Fehér szülő 9075 (800 bp); J2-SCoT29 és P2 Zöld szülő 9074 (700 bp); J2'-SCoT29 és P2 Zöld szülő 9074 (500 pb); L1-SCoT31 és P1 Fehér szülő 9075; N1-SCoT34 és P1 Fehér szülő 9075; N2-SCoT34 és P2 Zöld szülő 9074 (Forrás: Saját felvétel)

A 18. táblázat utolsó oszlopában megjelölt három DNS szakaszt plazmidba ligáltuk és kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk azokat, majd kolónia PCR-t hajtottunk végre az eredmények elemzéséhez (10. ábra). A SCoT1 primer esetén az 1-es és a 10-es, a SCoT34 primer esetén a 14-es és 16-os, míg a SCoT19 primer esetén a 4-es és a 6-os kolóniát választottuk ki plazmid izolálásra. Ezt követően emésztettük a plazmidot (11. ábra), hogy szekvenálásra az elvárt méretű DNS szakaszt küldjük.



10. ábra: A kolónia PCR eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen szemlélítve. (Saját készítés)

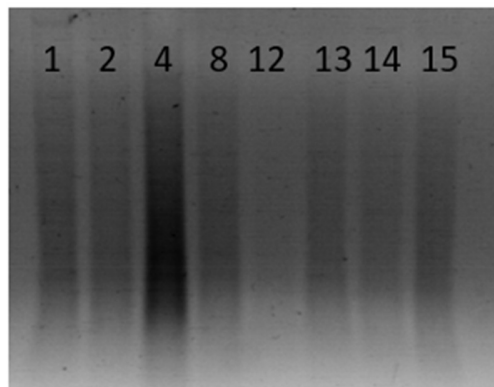


11. ábra: A plazmid emésztés eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen szemlélítve. (Saját készítés)

A SCoT1 primer esetén megkaptuk a kívánt (1,2-1,5 kb) DNS szakaszt mindkét kolónia esetén. A SCoT34 primerrel 14-es kolónia adta meg az elvárt méretet (700 bp). A SCoT19 primer esetén 2,5 kb helyet 1,2 kb méretet látunk a 4-es és 6-os kolóniák esetén. A pozitív eredményt mutató mintákat szekvenálni küldtük.

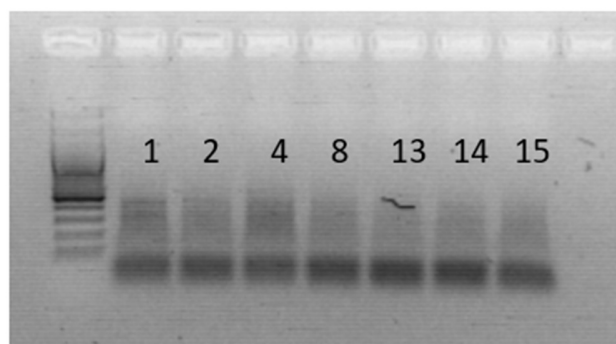
4.2. AFLP markerezés:

Az AFLP marker segítségével végzett kísérletben a rózsza színének alakulását elemeztük. A folyamatban részt vett DNS-izolátumok listája a következő: (1) P1 fehér-szülő, (2) P2 zöld-szülő, (4) 507 fehér-kontrol, (8) 517 fehér-kontrol, (12) 9062 zöld-kontrol, (13) 9064 zöld-kontrol, (14) F₂ fehér-pool, (15) F₂ zöld-pool (4. táblázat). Az emésztés eredményét a 12. ábra mutatja.



12. ábra: Az emésztés eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen való elválasztása. Mintasorrend.: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 4. minta: F₂507 fehér-kontrol, 8. minta: 517 fehér-kontrol, 12. minta: 9062 zöld-kontrol, 13. minta: 9064 zöld-kontrol, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool (Saját felvétel)

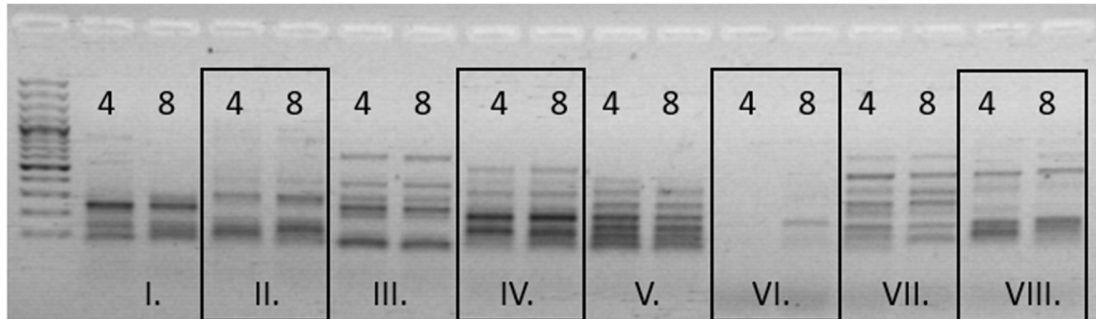
Mivel a 12-es mintának nem sikerült az emésztése, így azt kizártuk a további vizsgálatokból. A többi mintán preszelektív PCR-t hajtottunk végre, melynek eredménye a 13. ábrán látható.



13. ábra: Az előszelektív PCR eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen való detektálása. Mintasorrend: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 4. minta: 507 fehér-kontrol, 8. minta: 517 fehér-kontrol, 13. minta: 9064 zöld-kontrol, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool (Saját felvétel)

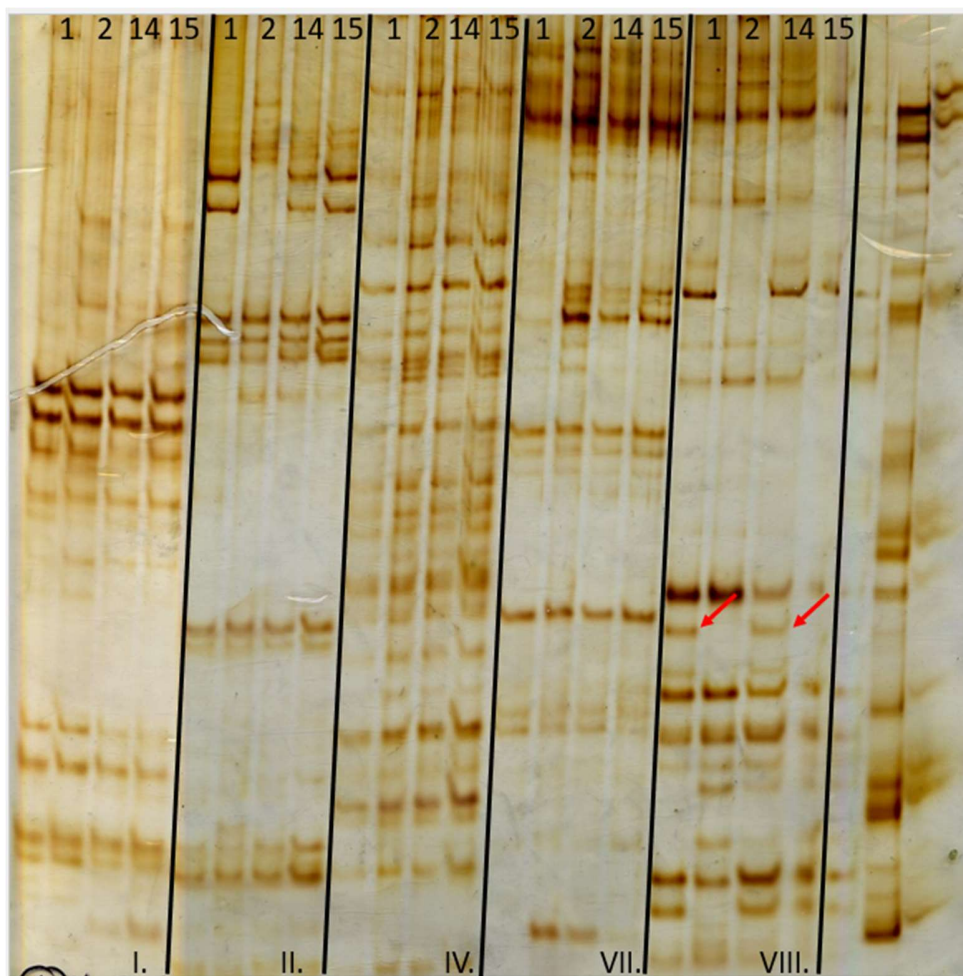
Az összes minta sikeres volt. Ötvenszeres hígítást követően szelektív PCR-t hajtottunk végre különböző primer kombinációkkal (16. táblázat). Ezt követően 1%-os agaróz gélen ellenőriztük

(14. ábra), hogy megfelelően jártunk-e el és a sikeres eredmények esetén poliakrilamid gélben való elválasztást végeztünk a tényleges polimorfizmus kiértékeléshez.

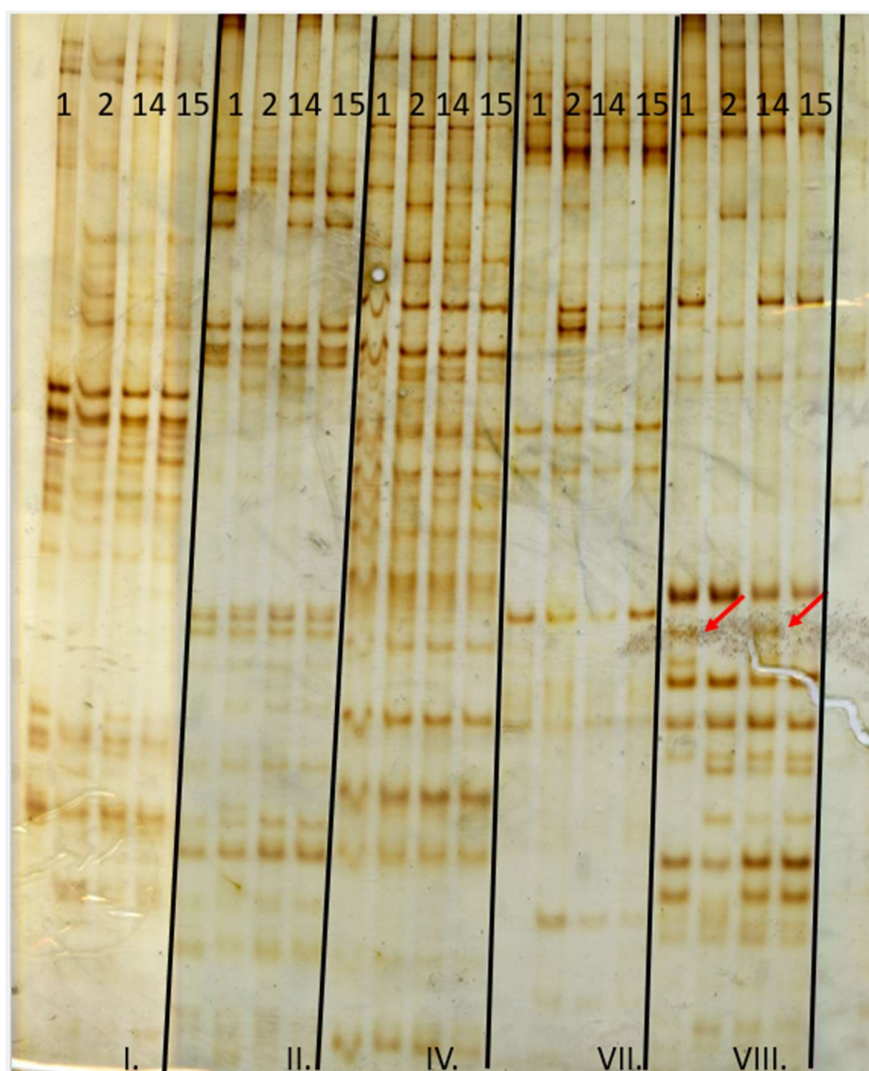


14. ábra: Kettő mintával való 1%-os EtBr festett agaróz gélben történő ellenőrző futtatás a szelektív PCR esetén. Mintasorrend: 4. minta: 507 fehér-kontrol, 8. minta: 517 fehér-kontrol; Párosítások: I.-ATC-3'+CTC-3', II.-ACC-3'+CTC-3', III.-AGC-3'+CTC-3', IV.-ATC-3'+CAC-3', V.-ACC-3'+CAC-3', VI.-ATC-3'+CTG-3', VII.-AGC-3'+CTG-3', VIII.-ACC-3'+CTG-3'; (Saját felvétel)

A hatos sorszámú kombináció használata nem volt sikeres, így azt kizártuk a további vizsgálatokból. Poliakrilamidgélre a fehér és zöld szülők mellet a fehér és zöld F₂ pool-okat használtuk az első tesztelésekhez, aminek eredményeit a 15. és 16. ábra mutatja be, ahol a piros nyilak feltehetőleg polimorf fragmentumra mutatnak.



15. DNS szakaszok kimutatása ezüst festéssel 8%-os poliakrilamid gélen. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool; Párosítások: I.-ATC-3'+CTC-3', II.-ACC-3'+CTC-3', IV.-ATC-3'+CAC-3', VII.-AGC-3'+CTG-3', VIII.-ACC-3'+CTG-3'; (Saját felvétel)



16. ábra: DNS szakaszok kimutatása ezüst festéssel 8%-os poliakrilamid gélen. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool; Párosítások: I.-ATC-3'+CTC-3', II.-ACC-3'+CTC-3', IV.-ATC-3'+CAC-3', VII.-AGC-3'+CTG-3', VIII.-ACC-3'+CTG-3'; (Saját felvétel)

A 15. és a 16. ábrán ugyan az a minta sorrend és primer pár kombináció látható, azzal az eltéréssel, hogy más PCR-reakcióból származnak a minták. Mindkét gélen megfigyelhetjük, hogy a VIII. szelektív primer kombináció (E-ACC-3'+M-CTG-3') egy fragmentumot eredményez a fehér szülő és fehér-pool mintákban, ami hiányzik a zöld szülő és zöld-pool esetén. A 15. ábrán a zöld-pool PCR terméke nem elég detektálható, azonban a 16. ábra eredménye megerősíti a fragmentum hiányát. Az említett polimorf fragmentumnak a kivágása és vissza tisztítása folyamatban van a további vizsgálatok folytatásához.

5. Összefoglalás:

Az utóbbi években rohamosan fejlődött a növénytermesztés és folyamatosan újabb fajtákat szeretnének, hogy a fogyasztói társadalmat minél jobban kielégíthessék. A nemesítők feladata nehezül, ugyanis a hagyományos, fenotípuson alapuló szelekciós módszerek, már nem elég gyorsak a mai változó világban. Manapság a morfológiai és biológiai markerek lehetővé tették a folyamat felgyorsítását.

Három agronómiai hasznos tulajdonság esetén végeztünk elemzést egy morfológiailag és fenológiailag nagy eltérést mutató két szülőtől származó szegregáló F₂ karfiol populációban. A molekuláris vizsgálatokat a következőképpen végeztük el: a hasadó populációból kiválasztott 6-6 szélső értéket mutató genotípusból egyedileg izolált DNS-t használva, a szélső értékeket reprezentáló F₂ „pool”-okat, azaz DNS keverékeket állítottunk elő. Ezt a hat szélső értékeket reprezentáló F₂ „pool”-t (fehér-zöld, korai-kései, alacsony-magas) tizenhárom SCoT markerrel elemeztük a szülők mellett tizenegy referencia genotípussal kiegészítve. Munkánk második részében fehér és zöld F₂ pool-okat és a szülőket AFLP markerrel is megvizsgáltunk nyolc szelektív kombinációban. Polimorf fragmentum esetén pedig a DNS szakasz pontos bázissorrendjének meghatározása után szekvencia specifikus SCAR-marker fejlesztést tűztünk ki célul, ami képes detektálni az adott polimorf DNS-szakaszt az adott tulajdonságra.

Először a DNS-izolátumokból PCR reakció segítségével a tizenhárom különböző szekvenciával rendelkező SCoT primerrel végeztünk kísérleteket. Majd az esetlegesen polimorfizmust mutató mintákkal a folyamatot megismételtük az eredeti SCoT primerével, ami kilenc SCoT primert érintett (SCoT1; SCoT3; SCoT12; SCoT18; SCoT19; SCoT22; SCoT29; SCoT31; SCoT34).

A SCoT12 primer esetén viszont az ismételt PCR-nél már a felbontott F₂ fehér-pool-lal is dolgoztunk, mert előzetes sejtések alapján úgy gondoltuk, hogy a kijelölt fragmentumunk csak egy F₂ egyedtől származik. A PCR-reakció bebizonyította, hogy igazunk volt, ugyanis csak az F₂53 egyedből származó genomi DNS-nél rajzolódott ki a sáv.

Ezt követően a vizsgálni kívánt fragmentumokat kivágtuk és tisztítottuk majd re-PCR segítségével bizonyítottuk a kivágás és tisztítás sikerességét. Amelyik mintánál visszakaptuk a várt band-eket ligálást hajtottunk végre és a kompetens sejtekbe való transzformálást követően kolónia PCR-t végeztünk el, hogy pontosan meghatározhassuk a kérdéses szekvenciák bázispár hosszát.

A kolónia PCR-t követően plazmid emésztést hajtottunk végre, hogy a magas költségekkel járó szekvenálásra már csak a biztosan kivágható szekvenciákat küldjük el. Az emésztésben 3 Scott primer vett részt 2-2 kolónia vizsgálatával. A SCoT1 primer esetén megkaptuk a kívánt (1,2-1,5 kb) DNS szakaszt mindkét kolónia esetén. A SCoT34 primerrel a 14-es kolónia adta meg az elvárt méretet (700 bp). A SCoT19 primer esetén 2,5 kb helyett 1,2 kb méretet láttunk a 4-es és 6-os kolóniák esetén. A pozitív eredményeket szekvenálásra küldtük további kísérletek céljából.

Az AFLP marker használatakor csökkentett minta számmal dolgoztunk (P1, P2, 507 fehér-kontrol, 517 fehér-kontrol, 9062 zöld-kontrol, 9064 zöld-kontrol, F₂ fehér-pool, F₂ zöld-pool), tehát csak a rózsza színére koncentráltunk. Sikeres genomi emésztést követően adaptereket ligáltunk az ismeretlen DNS-szakaszainkhoz, majd preszelektív és szelektív-PCR-t hajtottunk végre. Nyolc szelektív kombinációból egy estén tudtunk polimorf fragmentumot meghatározni (E-ACC-3'+ M-CTG-3'), ami jelen volt a fehér szülő és F₂ fehér pool-ban, viszont hiányzott a zöld szülő és F₂ zöld-pool esetén. Ezen DNS fragmentum kivágása folyamatban van további kísérletek céljából.

Összeségében sikeresen kiválasztottunk és plazmidba ligáltunk SCoT1 primerrel egy polimorf fragmentumot az alacsony szár tulajdonságára, amit szekvenálást követően SCAR marker fejlesztésre tervezünk használni.

6. Irodalomjegyzék:

1. Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in Plant Science; Plant Cell Reports; Vol. 27; p. 617–631
2. Andersen J.R., Lübberstedt T. (2003): Functional markers in plants; Trends in Plant Science; Vol. 8 (11); p. 554–550
3. Balázs S. (1994): Zöldségtermesztők kézikönyve; Budapest; Mezőgazdasági Kiadó; p. 476, 511
4. Barone A. (2004): Molecular marker-assisted selection for potato breeding; American Journal of Potato Research; Vol. 81; p. 111–117
5. Botha A. M., Venter E. (2000): Molecular marker technology linked to pest and pathogen resistance in wheat breeding; South African Journal of Science; Vol. 96; p. 233–240
6. Castro I., D’Onofrio C., Martín J. P., Ortiz J. M., De Lorenzis G., Ferreira V., Pinto-Carnide O. (2011). Effectiveness of AFLPs and Retrotransposon-Based Markers for the Identification of Portuguese Grapevine Cultivars and Clone. Molecular Biotechnology; Vol. 52; p. 26–39
7. Cernák I. (2008): A Solanum stoloniferum eredetű burgonya Y vírus (PVY) extrém rezisztencia gén (R_{ysto}) markerezése; Keszthely; Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar; p. 20–24
8. Chiu L. W., Zhou X., Burke S., Wu X., Prior R. L., Li L. (2010): The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor; Plant Physiology; Vol. 154; p. 1470–1480
9. Chiu L. W., Li L. (2012): Characterization of the regulatory network of BoMYB2 in controlling anthocyanin biosynthesis in purple cauliflower; Planta; Vol. 236; p. 1153–1164
10. Collard B. C. Y., Jahufer M. Z. Z., Brouwer J.B., Pang E. C. K. (2005): An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: the basic concepts; Euphytica; Vol. 142; p. 169–196
11. Collard B. C. Y., Mackill D. J. (2009): Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants Plant Mol Biol Rep; Vol. 27; p. 86–93
12. Crisp P., Walkey D. G. A., Bellman E., Roberts E. (1975): A mutation affecting curd colour in cauliflower (Brassica oleracea L. var. Botrytis DC); Euphytica; Vol. 24; p. 173–176
13. Crisp P. (1982): The use of an evolutionary scheme for cauliflowers in the screening of genetic resources; Euphytica; Vol. 31; p. 125–174
14. Crisp P., Angell S. (1985): Genetic control of green curd colour in cauliflower. Annals of Applied Biology; Vol. 107; p. 601–603
15. Dziechciarkova M., Lebeda A., Dolezalova I., Astley D. (2004): Characterization of Lactuca spp. germplasm by protein and molecular markers; Plant Soil Environ; Vol. 50; p. 47–58
16. Farooq S., Azam F. (2002): Molecular Markers in Plant Breeding-I: Concepts and Characterization; Pakistan Journal of Biological Sciences; Vol. 5 (10); p. 1135–1140

17. Gorji A. M., Poczai P., Polgár Zs., Taller J. (): Efficiency of Arbitrarily Amplified Dominant Markers (SCOT, ISSR and RAPD) for Diagnostic Fingerprinting in Tetraploid Potato; American Journal of Potato Research; Vol. 88; p. 226–237
18. Gostimsky S. A., Kokaeva Z. G., Konovalov F. A. (2005): Studying plant genome variation using molecular markers; Russian Journal of Genetics; Vol. 41; p. 378–388
19. Gupta P. K., Varshney R. K., Sharma P. C., Ramesh B. (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding; Plant Breed; Vol. 118 (5); p. 369–390
20. Gupta P. K., Rustgi S. (2004): Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants; Functional and Integrative Genomics; Vol. 4; p. 139–162
21. Hosaka K., Hosaka Y., Mori M., Maida T., Matsunaga H. (2001): Detection of simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in tetraploid; American Journal of Potato Research; Vol. 78; p. 191–196
22. Huaqiang T., Xin W., Zhangjun F., Huanxiu L., Yaakov T., Mazourek M., Li L. (2020): Genetic mapping of green curd gene Gr in cauliflower; Theoretical and Applied Genetics; Vol. 133; p. 353–364
23. Jacobs J. M. E., Van Eck H. J., Horsman K., Arens P. F. P., Verkerk-Bakker B., Jacobsen E., Pereira A., Stiekema W. J. (1996): Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*; Molecular Breeding; Vol. 2; p. 51–60
24. Kádár A., Kardos Gy., Maczák B., Terbe I., Glits M., Péntes B., Szani Sz. (1995): Káposztafélék: Fejes, vörös, kelkáposzta, karfiol, karalábé, brokkoli, bimbóskel, kínai kel; Budapest; OLITOR Szaktanácsadó és Inf. szolgálat; p. 25–26
25. Kelly J. D., Miklas P. N. (1998): The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean; Molecular Breeding; Vol. 4; p. 1–11
26. Kristóf L. (2000): Államilag elismert fajták vizsgálati eredményei; Budapest; Agrármarketing Centrum
27. Lee JW., Kim YC., Jo IH., Seo AY., Lee JH., Kim OT., Hyun DY., Cha SW., Bang KH., Cho JH. (2011): Development of an ISSR-Derived SCAR Marker in Korean Ginseng Cultivars (*Panax ginseng* C. A. Meyer); The Korean Society of Ginseng Journal of Ginseng Research; Vol. 35 (1); p. 52
28. Li L., Paolillo D. J., Parthasarathy M. V., Dimuzio E. M., Garvin D. F. (2001): A novel gene mutation that confers abnormal patterns of beta carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis); Plant Journal; Vol. 26; p. 59–67
29. Livingstone K. D., Lackney V. K., Blauth J. R., Wijk R., Jahn M. K. (1999): Genom mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae; Genetics; Vol. 152 (3); p. 1183–1202
30. Manchali S., Murthy K. N. C., Patil B. S. (2012): Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables; Journal of Functional Foods; Vol. 4; p. 94–106
31. Mártonffy B. (2001): Káposztafélék: Fejes, vörös, kelkáposzta, karfiol, karalábé, brokkoli, bimbóskel, kínai kel; Budapest; Mezőgazda Kiadó
32. Michelson R. W., Paran I., Kesseli R. V. (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in

- specific genomic regions by using segregating populations; Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA; Vol 88 (21); p. 9828–9832
33. Nesbitt M. (2005): The Cultural History of Plants; New York/London; Routledge; p. 116
 34. Paran I., Michelmore R. W. (1993): Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce; Theoretical and Applied Genetics; Vol. 85; p. 985-993
 35. Paterson A. H., Tanksley S. D., Sorrells M. E. (1991): DNA Markers in Plant Improvement; Advances in Agronomy; Vol. 46; p. 39-90
 36. Pedryc A. (2008): Kajszfajták genetikai jellemzése mikroszatellit és S-lókuszt polimorfizmus alapján; Budapest; Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar; p. 22-25
 37. Pascual-Teresa S. - Sanchez-Ballesta M. T. (2007): Anthocyanins: from plant to health; Phytochemistry Reviews; Vol. 7; p. 281–299
 38. Roberts R. J., Murray K. (1976); Restriction endonucleases; CRC Critical Reviews in Biochemistry; Vol. 4 (2); p. 123–164
 39. Salvi S., Tuberosa R. (2005): To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges; Trends in Plant Science; Vol. 10; p. 297–304
 40. Schlieper C. A. (1992): Grundfragen der Ernährung; Verlag Dr Felix Büchner, Handwerk und Technik, Hamburg; Vol. 11
 41. Schochetman G., Chin-Yih Ou, Jones W. K. (1988): Polymerase Chain Reaction; The Journal of Infectious Diseases; Vol. 158 (6); p. 1154
 42. Singh A. K., Singh J., Saini S. S. (1978): Inheritance of curd quality in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.); Horticultural Research; Vol. 18; p. 1-6
 43. Sleper D. A., Poehlman J.M. (2006): Breeding Field Crops; Oxford; Blackwell Publishing; 5. kiadás
 44. Stromberg J. (2015): Kale, Brussels sprouts, cauliflower, and cabbage are all varieties of a single magical plant species; Vox; <https://www.vox.com/xpress/2014/8/6/5974989/kale-cauliflower-cabbage-broccoli-same-plant>
 45. Terbe I., Hodossi S., Kovács A. (2005): Zöldségtermesztés termesztőberendezésekben; Budapest; Mezőgazda Kiadó; p. 164-167
 46. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabea M., (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting; Nucleic Acids Research; Vol. 23 (21); p. 4407-4414
 47. Zhou X., Fei Z., Thannhauser T. W., Li L. (2011): Transcriptome analysis of ectopic chloroplast development in green curd cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*); BMC Plant Biology; Vol. 11; p. 169

7. Táblázatok és ábrák jegyzéke:

Ábrák jegyzék:

1. ábra: A SCoT marker működési mechanizmusa	11
2. ábra: A: P1-es szülő vonal; B: P2-es szülő vonal.	12
3. ábra: A kísérletbe vont 6-6 F ₂ egyedek A-zöld; B-fehér; C-korai; D-késői; E-alacsony; F-magas.....	15
4. ábra: SCoT primer PCR protokoll	18
5. ábra: A pGemT-Easy plazmid térképe	20
6. ábra: Hat SCoT marker eredménye 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1.: Fehér szülő 9075; 2.: Zöld szülő 9074; 3.: 506; 4.: 507; 5.: 512; 6.: 514; 7.: 516; 8.: 517; 9.: 526; 10.: 527; 11.: 532; 12.: 9062; 13.: 9064; 14.: F ₂ fehér pool; 15.: F ₂ zöld pool; 16.: F ₂ korai pool; 17.: F ₂ kései pool; 18.: F ₂ magas pool; 19.: F ₂ alacsony pool	28
7. ábra: Hét SCoT marker eredménye 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1.: Fehér szülő 9075; 2.: Zöld szülő 9074; 3.: 506; 4.: 507; 5.: 512; 6.: 514; 7.: F ₂ 516; 8.: 517; 9.: 526; 10.: 527; 11.: 532; 12.: 9062; 13.: 9064; 14.: F ₂ fehér pool; 15.: F ₂ zöld pool; 16.: F ₂ korai pool; 17.: F ₂ kései pool; 18.: F ₂ magas pool; 19.: F ₂ alacsony pool.....	29
8. ábra: Kilenc SCoT marker ellenőrzésének eredménye 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1.: Fehér szülő 9075; 2.: Zöld szülő 9074; 3.: 506; 9.: 526; 10.: 527; 12.: 9062; 13.: 9064; 14.: F ₂ fehér pool; 15.: F ₂ zöld pool; 16.: F ₂ korai pool; 17.: F ₂ kései pool; 18.: F ₂ magas pool; 19.: F ₂ alacsony pool; *SCoT12 esetén a felbontott pool-ból látható 4 egyed (3. táblázat).....	30
9. ábra: a re-PCR eredményei 1,5%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: A1-SCoT1 és P1 Fehér szülő 9075; B1-SCoT3 és P1 Fehér szülő 9075; C1-SCoT12 és F ₂ 53; G1-SCoT19 és P1 Fehér szülő 9075 (2,5 kb); G2-SCoT19 P1 Fehér szülő 9075 (2 kb); J1-SCoT29 és P1 Fehér szülő 9075 (800 bp); J2-SCoT29 és P2 Zöld szülő 9074 (700 bp); J2'-SCoT29 és P2 Zöld szülő 9074 (500 pb); L1-SCoT31 és P1 Fehér szülő 9075; N1-SCoT34 és P1 Fehér szülő 9075; N2-SCoT34 és P2 Zöld szülő 9074	31
10. ábra: A kolónia PCR eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve.....	32
11. ábra: A plazmid emésztés eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen szemléltetve.	32
12. ábra: Az emésztés eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen való elválasztása. Mintasorrend.: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 4. minta: F ₂ 507 fehér-kontrol, 8. minta: 517 fehér-kontrol, 12. minta: 9062 zöld-kontrol, 13. minta: 9064 zöld-kontrol, 14. minta: F ₂ fehér-pool, 15. minta: F ₂ zöld-pool.....	33

13. ábra: Az előszelektív PCR eredménye 1%-os EtBr festett agaróz gélen való detektálása. Mintasorrend: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 4. minta: 507 fehér-kontrol, 8. minta: 517 fehér-kontrol, 13. minta: 9064 zöld-kontrol, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool..... 33
14. ábra: Kettő mintával való 1%-os EtBr festett agaróz gélben történő ellenőrző futtatás a szelektív PCR esetén. Mintasorrend: 4.: 507 fehér-kontrol, 8.: 517 fehér-kontrol; Párosítások: I.-ATC-3'+CTC-3', II.-ACC-3'+CTC-3', III.-AGC-3'+CTC-3', IV.-ATC-3'+CAC-3', V.-ACC-3'+CAC-3', VI.-ATC-3'+CTG-3', VII.-AGC-3'+CTG-3', VIII.-ACC-3'+CTG-3';..... 34
15. DNS szakaszok kimutatása ezüst festéssel 8%-os poliakrilamid gélen. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool; Párosítások: I.-ATC-3'+CTC-3', II.-ACC-3'+CTC-3', IV.-ATC-3'+CAC-3', VII.-AGC-3'+CTG-3', VIII.-ACC-3'+CTG-3';..... 35
16. ábra: DNS szakaszok kimutatása ezüst festéssel 8%-os poliakrilamid gélen. A piros nyilak polimorf DNS szakaszt jelölnek. Mintasorrend: 1. minta: Fehér szülő 9075, 2. minta: Zöld szülő 9074, 14. minta: F₂ fehér-pool, 15. minta: F₂ zöld-pool; Párosítások: I.-ATC-3'+CTC-3', II.-ACC-3'+CTC-3', IV.-ATC-3'+CAC-3', VII.-AGC-3'+CTG-3', VIII.-ACC-3'+CTG-3';..... 36

Táblázatok jegyzéke:

1. táblázat. Gyakran használt molekuláris markerezési technikák összehasonlítása..... 9
2. táblázat: P1 és P2 szülő vonalak 3 tulajdonságának adatai, 3-3 egyed esetén..... 13
3. táblázat: A kísérletbe vont 36 db F₂ egyed a 3-3-tulajdonságának megjelölésével..... 13
4. táblázat: A molekuláris vizsgálatba bevont tételek nevei és három tulajdonságban fenotípusuk..... 14
5. táblázat: SCoT primer Master Mix összetevőinek listája és kiszámításának segédletével..... 17
6. táblázat: A kísérletben használt SCoT primerek és szekvenciájuk..... 18
7. táblázat: M13 primer pár szekvenciája..... 22
8. táblázat: Kolónia PCR Master Mix összetevőinek listája és kiszámításának segédlete..... 22
9. táblázat: Kolónia PCR protokoll..... 22
10. táblázat: A plazmid emésztéshez használt összetevők és mennyiségek..... 23
11. táblázat: Emésztési mixhez használt hozzávalók listája..... 24
12. táblázat: Az adapter ligálásához használt összetevők..... 25
13. táblázat: A felhasznált adapterek szekvenciái..... 25
14. táblázat: Az AFLP preszelektív PCR során használt szekvenciák..... 25
15. táblázat: AFLP preszelektív PCR Master Mix összetevőinek listája és kiszámításának segédlete..... 26
16. táblázat: A szelektív PCR-hez használt szelektív primerek kombinációi..... 26
17. táblázat: 8%-os poliakrilamid gél összetevőinek listája..... 27
18. táblázat: A gélből kivágott fragmentumok listája és eredménye a re-PCR-ben..... 30

8. Köszönetnyilvánítás:

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik a segítségemre voltak a dolgozat megírásában.

Ezutón is szeretném megköszönni Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kittinek, konzulensemnek szakmai iránymutatását, a dolgozatom elkészítéséhez nyújtott segítségét, a kutatáshoz szükséges körülmények biztosítását, és a bizalmat, amellyel számomra lehetővé tette az önálló munkavégzés elsajátítását, így gyakorlatban is megtanulhattam az általa megtanított fogásokat, valamint készséges és lelkiismeretes javításért.

Külön köszönet jár Amany Mohamed Elrefaey Ragab Mezőgazdasági biotechnológus Msc hallgatónak támogató, segítőkész munkájáért. Mindig bizalommal fordulhattam hozzá a közös munkánk alatt.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Róth Fruzsínának és Czinge Dórának, hogy felajánlották ezt a kutatási témát, illetve lehetőséget, hogy velük dolgozhassak. Külön köszönet illeti a Syngenta valamennyi dolgozóját, akik, ha egy apró részvétellel is lehetővé tették, hogy ez a kísérlet valóra válhasson.

9. Függelék:

1. Melléklet: Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II.

5.1 Genomi DNS növényből

Az elkészítés megkezdése előtt

- Ellenőrizze, hogy a PW2 mosópuffert és az RNáz A-t a 3. szakasznak megfelelően készítette-e el.
- Melegítsük elő a PE elúciós puffert 65 °C-ra.

Megjegyzés: A NucleoSpin® Plant II készletek két különböző lizispuffert tartalmaznak a leggyakoribb növényfajok esetében optimális eredmények eléréséhez. Kérjük, olvassa el a 2.5. szakaszt az egyedi növényi minta számára optimális lizispuffer-rendszer kiválasztásához, valamint a még több növényi minta feldolgozására vonatkozó információkért. mintaanyag feldolgozása a következő protokollban javasolt.

1 A minta homogenizálása

Homogenizáljon legfeljebb 100 mg nedves tömegű vagy legfeljebb 20 mg száraz tömegű (liofilizált) növényi anyagot (a homogenizálási módszereket lásd a 2.4. szakaszban).



Homogenizálja a mintákat

Folytassuk a sejtek lizist a PL1 pufferrel (2. a) lépés), vagy alternatívaként PL2 pufferrel (2. b) lépés).

2 a Sejtlízis a PL1 pufferrel

A kapott port helyezze át egy új csőbe, és adjon hozzá **400 µL PL1 puffer**t. Az elegyet alaposan vortexeljék.

Megjegyzés: Ha a minta nem szuszpendálható könnyen, mert például a növényi por túl sok puffert szív fel, további **PL1 puffer**t adhatunk hozzá. Vegye figyelembe, hogy az RNáz A (2. lépés) és a **PC puffer** (4. lépés) térfogatát arányosan növelni kell.

Adjunk hozzá **10 µL RNáz A** oldatot, és alaposan keverjük össze a mintát.

Inkubáljuk a szuszpenziót 10 percig 65 °C-on.

Megjegyzés: Egyes növényi anyagok esetében előnyös lehet az inkubációs időt 30-60 percre növelni.

Folytassa a 3. lépéssel.



+ 400 µL PL1

+ 10 µL RNáz A

**65 °C,
10 perc**

3 A nyers lizátum szűrése / tisztítása

Helyezzen egy **NucleoSpin® szűrőt** (lila gyűrű) egy új gyűjtőcsőbe (2 ml), és töltsse a lizátumot a csőbe. Centrifugáljon **2 percig 11 000 x g-n**, gyűjtse össze az átlátszó átfolyót, és dobja el a NucleoSpin® Filtert.

Ha nem az összes folyadék ment át a szűrőn, ismételje meg a centrifugálási lépést.

Ha az átfolyóban pellet látható, a tiszta felülúszót helyezze át egy új 1,5 ml-es mikrocentrifugációs csőbe (nem tartozék).

Alternatív megoldásként centrifugálja a nyers lizátumot 5 percig 11 000 x g-nél, és a felülúszót helyezze át egy új csőbe, vagy a szilárd részecskék teljes eltávolítása érdekében az előzetesen megtisztított felülúszót vezesse át a NucleoSpin® szűrőn.



**11,000 x g,
2 perc**

4 DNS-kötési viszonyok beállítása

Adjunk hozzá **450 µL PC puffert**, és alaposan keverjük össze fel-le pipetázással (5 alkalommal) vagy vortexeléssel.



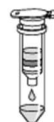
+ 450 µl PC

5 DNS megkötése

Helyezzen egy **NucleoSpin® Plant II oszlopot** (zöld gyűrű) egy új gyűjtőcsőbe (2 ml), és töltsön be maximum 700 µl mintát.

Centrifugáljon **1 percig 11 000 x g-n**, és dobja el az átfolyó anyagot.

A NucleoSpin® Plant II oszlop maximális töltési kapacitása 700 µL. Nagyobb mintamennyiség esetén ismételje meg a betöltési lépést.



**Töltse be a
lizátumot**

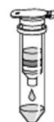
**11,000 x g,
1 perc**

6 Szilika membrán mosása és szárítása

1. mosás

Adjunk **400 µL PW1 puffert** a NucleoSpin® Plant II oszlophoz. Centrifugáljuk **1 percig 11 000 x g-nél**, és dobjuk el az átfolyó folyadékot.

Megjegyzés: Bár a PW1 pufferrel történő mosás növeli a tisztaságot, bizonyos esetekben kissé csökkentheti a végső hozamot.



+ 400 µl PW1

**11,000 x g,
1 perc**

2. mosás

Adjunk **700 µL PW2 puffert** a NucleoSpin® Plant II oszlophoz. Centrifugáljuk **1 percig 11 000 x g-n**, és dobjuk el az átfolyó folyadékot.

+ 700 µl PW2

**11,000 x g,
1 perc**

3. mosás

Adjunk további **200 µL PW2 puffert** a NucleoSpin® Plant II oszlophoz. Centrifugáljuk **2 percig 11 000 x g-n** a mosópuffer eltávolítása és a szilikamembrán teljes szárítása érdekében.

+ 200 µl PW2

**11,000 x g,
2 perc**

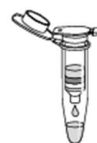
7 DNS eluálása

Helyezze a NucleoSpin® Plant II oszlopot egy új 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe (nem tartozék).

Pipetázzon **50 µL PE puffert (65 °C)** a membránra. Inkubálja a NucleoSpin® Plant II oszlopot 5 percig 65 °C-on. Centrifugáljon **1 percig 11 000 x g**-n a DNS eluálásához.

Ismételje meg ezt a lépést egy újabb **50 µL PE pufferrel (65 °C)**, és eluálja ugyanabba a csőbe.

Megjegyzés: A PE elúciós puffer nem tartalmaz EDTA-t. Ha a tisztított DNS tárolása után DNS-bomlást észlelünk, az elúció előtt állítsuk be az EDTA-t a PE pufferben 1 mM-ra.



**+ 50 µl PE
65 °C,
5 perc**



**11,000 x g,
1 perc**

**+ 50 µl PE
65 °C,
5 perc**

**11,000 x g,
1 perc**

2.Melléklet: Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up

6 Jegyzőkönyv DNS extrakcióhoz agaróz gélekből

Az elkészítés megkezdése előtt

- Ellenőrizze, hogy az NT3 mosópuffert a 3. szakasz szerint készítették-e el.

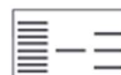
1 DNS-fragmentum kivágása / gélselet oldása

Vegyen egy tiszta szikét, hogy kivágja a DNS-fragmentumot az agarózgélből. Óvatosan vágja ki a fragmentumot tartalmazó gélseletet, hogy a gél térfogata minimálisra csökkenjen.

Megjegyzés: A DNS károsodásának elkerülése érdekében minimalizálja az UV-expozíció idejét.

Határozza meg a gél szelet súlyát, majd helyezze át egy tiszta kádba.

Minden **100 mg agarózgélhez adjunk 200 µl NT puffert**. A >2% agarózt tartalmazó gélek esetében duplázza meg az NT puffer térfogatát. A gélselet maximális mennyisége NucleoSpin Extract II Columnként 400 mg vagy 200 mg magas százalékos gél >2%. Ebben az esetben 2 betöltési lépésre van szükség (2. lépés).



**+ 200 µl NT
per
100 mg gél**



**50 °C
5–10 perc**

Inkubáljuk a mintát **5-10 percig 50 °C-on**. A mintát 2-3 percenként röviden vortexelje, amíg a gélselet **teljesen fel nem oldódik!**

2 DNS megkötése

Helyezzen egy **NucleoSpin Extract II Column**ot egy gyűjtőcsőbe (2 ml), és töltse be a mintát.

Centrifugáljuk **1 percig 11000 x g**-n. Dobjuk el az átfolyó folyadékot, és helyezzük vissza az oszlopot a gyűjtőcsőbe.



betöltési minta



11,000 x g
1 perc

3 Szilika membrán mosása

Adjunk **700 µl NT3 puffert** a NucleoSpin Extract II Column-hoz. Centrifugáljon **1 percig 11 000 x g**-n. Dobja el az átfolyó folyadékot, és helyezze vissza az oszlopot a gyűjtőcsőbe.

Megjegyzés: A kaotróp só átvitele alacsony A /A értékeket eredményezhet. A nagyon érzékeny rákövetkező alkalmazások esetén, vagy ha a teljes eluátumot fel kell használni, a problémák megelőzése érdekében kövesse a 8.1. (A DNS szuboptimális teljesítménye szekvenálási, restrikciós vagy ligációs reakciókban - A kaotróp sók áthaladása) fejezetben megadott utasításokat.



+ 700 µl NT3



11,000 x g
1 perc

4 Szilika membrán szárítása

Centrifugáljuk **2 percig 11 000 x g**-n az NT3 puffer teljes eltávolításához. Ügyeljen arra, hogy a centrifugából és a gyűjtőcsőből való eltávolítás során a centrifuga ne érintkezzen az átfolyó folyadékkal.

Megjegyzés: Az NT3 pufferből visszamaradt etanol gátolhatja az enzimátikus reakciókat. Az etanol teljes eltávolítása az oszlopok 2-5 perces 70°C-on történő inkubálásával biztosítható az elúció előtt.



11,000 x g
2 perc

5 DNS eluálása

Helyezze a NucleoSpin Extract II Column-ot egy új 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe (nem tartozék). Adjunk hozzá **15-50 µl NE puffert** és inkubáljuk **szobahőmérsékleten (18-25°C)** 1 percig. Centrifugáljuk **1 percig 11 000 x g**-n.

Megjegyzés: A nagyobb fragmentumok (>5-10 kbp) hozama növelhető előmelegített elúciós puffer (70°C) használatával.



+ 15-50 µl NE

RT
1 perc



11,000 x g
1 perc

3.Melléklet: Macherey-Nagel NucleoSpin Plazmid EasyPur

5 NucleonSpin Plazmid EasyPur protokoll

Az elkészítés megkezdése előtt:

- Ellenőrizze, hogy az AQ mosópuffert a 3. szakasz szerint készítették-e el.

1 Baktériumsejtek tenyésztése és betakarítása

Használjon **2-10 ml telített E.coli kultúrát** (lásd 8. oldal, 3. táblázat), pelletálja a sejteket standard asztali mikrocentrifugában **30 másodpercig >12 000 x g-n**.

Dobja el a felülúszót, és távolítsa el a lehető legtöbb folyadékot.



> 12,000 x g,
30 s

2 Sejtlízis

Adjunk hozzá 150 µl A1 puffert. A sejt pelletet teljesen reszuszpendálja vortexeléssel vagy fel-le pipetázással. Az A2 puffer hozzáadása előtt győződjön meg arról, hogy nem maradtak sejtsomók!

Figyelem: ellenőrizze az A2 puffert a kicsapódott SDS szempontjából. Ha megfelelő csapadék látható, melegítse a puffert néhány percig 30-40°C-on, hogy a csapadék teljesen feloldódjon. Használat előtt hűtse le a puffert szobahőmérsékletre (18-25°C).

Adjunk hozzá **250 µl A2 puffert**. Óvatosan keverje össze a csövet 5 alkalommal megfordítva. A genomi DNS nyírásának elkerülése érdekében ne keverjük fel. Inkubáljuk **szobahőmérsékleten (18-25 °C)** legfeljebb 2 percig, vagy amíg a lizátum tiszta nem lesz.

Adjunk hozzá **350 µl A3 puffert**. A cső megfordításával alaposan keverje össze, amíg a LyseControl **színtelen** nem lesz az egész lizátumban, kék szín nyomai nélkül. A genomi DNS nyíródásának elkerülése érdekében ne keverje vortexszel!

+ 150 µl A1

reszuszpendáció

+ 250 µl A2

Mix

RT, 2 perc

+ 350 µl A3

Mix



3 A lizátum tisztítása

Centrifugáljuk **3 percig teljes fordulatszám**on (>12000 x g).



> 12,000 x g,
3 perc

4 DNS megkötése

Helyezzen egy NucleonSpin Plazmid EasyPur oszlopot egy gyűjtőcsőbe (2 ml), és öntse a 3. lépésből származó felülúszót az oszlopra.



töltse be a felülúszót

Centrifugáljuk **30 másodpercig 1000-2000 x g-n**.



**1,000–
2,000 x g,
30 s**

Dobja el az átfolyó folyadékot, és helyezze vissza a spinoszlopot a gyűjtőcsőbe.

5 Szilika membrán mosása és szárítása

Adjunk hozzá **450 µl AQ puffert** (etanollal kiegészítve, lásd a 3. szakaszt).



+ 450 µl AQ

Centrifugáljuk **3 perccig teljes fordulatszámon** (>12000 x g).



**>12,000 x g,
1 perc**

Nagyon óvatosan dobja ki a gyűjtőcsövet és az átfolyócsövet, és győződjön meg arról, hogy a centrifugálócsésze kivezetőnyílása nem ér a mosópuffer felületéhez. Ellenkező esetben ismételje meg a centrifugálási lépést.

Megjegyzés: Az etanol átvitelének minimálisra csökkentése érdekében a jobb teljesítmény érdekében a későbbi alkalmazásokban 10-15 perccig inkubálja a spin sapkát 37°C-on, hogy a szilikamembrán teljesen megszáradjon.

6 DNS eluálása

Helyezze a NucleonSpin Plazmid EasyPur oszlopot egy 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe (nem tartozék), és adjon hozzá **50 µl AE puffert**.



+ 50 µl AE

RT, 1 perc

Inkubáljuk **1 perccig szobahőmérsékleten** (18-25°C).

Centrifugáljuk **1 perccig teljes fordulatszámon** (>12000 x g).



**>12,000 x g,
1 perc**

Megjegyzés: A hatékonyabb elúciós eljárásokról és alternatív elúciós pufferekről (például TE-puffer vagy víz) lásd a 2.4. szakaszt.

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Tóth Boglárka
A Hallgató Neptun kódja: GONC64
A dolgozat címe: F2 KARFIOL POPULÁCIÓ MOLEKULÁRIS MARKEREZÉSE
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Genetika és Biotechnológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Genetika és Genomika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottnak veszem, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumba. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem MATER Hallgatói Dolgozatok repozitóriumban.

Kelt: 2024 év 10 hó 31 nap


Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Tóth Boglárka (név) (hallgató Neptun azonosítója: GONC64 konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem³

Kelt: Gödöllő, 2024. 10. 31.

Tóth Boglárka

belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.