

SZAKDOLGOZAT

Kelemen Máté Richárd

2025



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Kertészettudományi Intézet

Kertésztechnológiai alapképzési szak

**Biotechnológiai módszerek alkalmazása káposztafélék
nemesítési alapanyagán**

Belső konzulens: Dr. Tóth-Lencsés Kitti
Egyetemi adjunktus

intézete/tanszéke: MATE, GBI, Genetika
és Genomika tanszék

Külső konzulens: Dr. Tóth Zoltán MATE, GBI

Készítette: **Kelemen Máté Richárd**

Gödöllő

2025

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
Abstract	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
1 Irodalmi áttekintés	7
1.1 <i>Brassica oleracea</i> változatok bemutatása	7
1.2 <i>Brassica oleracea</i> jellemzése.....	8
1.2.1 <i>Brassica oleracea</i> egészségügyi szempontból.....	8
1.3 <i>Brassica rapa</i> jellemzése	9
1.4 Szövettenyésztés sterilizálása	9
1.5 Makro- és mikro tápanyagok fontossága	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
1.5.1 Táptalajt alkotó elemek.....	11
1.5.2 Agar-agar	13
1.5.3 Vitaminok szerepe	13
1.6 Növekedést szabályozó anyagok	14
1.6.1 Hormonok	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
1.7 Hajtástenyészetek bemutatása.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
1.8 Diagnosztika	Hiba! A könyvjelző nem létezik.
1.9 A pcr működése	17
2 Anyag és módszer	19
2.1 Növényanyag	19
2.2 In vitro kísérlet.....	20
2.3 Genotipizálás	23
2.3.1 A DNS izolálás	23
2.3.2 PCR reakció	25
2.3.3 PCR körülmények.....	26
2.3.4 Agaróz gélelektroforézis.....	27
3 Eredmények	28

Bevezetés

Napjainkban a káposztafélék az egyik legfontosabb zöldségnövényeinknek tekinthetők tápanyagtartalmuk, és változatosságuk miatt. Termesztést tekintve a harmadik helyen állnak világ szinten. Származási helyük a Földközi tenger partvidékére tehető, hidegtűrő növények így korai termesztésre kiválóak. Változatosságuk a fogyasztott részeiken mutatkozik meg, például fogyasztjuk az óriás rügyét a káposztának, a virágzatát a karfiolnak, a hónaljrügyét a kelbimbónak, levelét a kínai kelnek, szárgumóját a karalábénak. Kiváló tápanyag és rosttartalmuk miatt egyre nagyobb szerepet kapnak az egészségtudatos emberek táplálkozási szokásaiban.

Az *in vitro* szaporítás lehetőséget ad a növények gyors szaporítására. Ezt nagy mértékben ki tudjuk használni a laboratóriumokban, mivel a steril, kontrollált körülmények biztosítják, hogy a növények regenerálódása nagyobb eséllyel végbe menjen. Ez azt jelenti, hogy kisebb helyen nagy mennyiségű növényanyagot vagyunk képesek előállítani, úgy, hogy az genetikailag azonos maradjon.

A DNS alapú szelekció felfedezésével a nemesítők, és a kutatók munkája nagy mértékkel megkönnyebbedett. Ez a módszer végett a nemesítőknek nem csak a fenotípusos tulajdonságok alapján szelektálhatják a vizsgálandó anyagot, hanem utat nyitott arra, hogy a genotípus alapján válasszák ki a számunkra hasznos génekkel rendelkező növényeket.

Célkitűzés

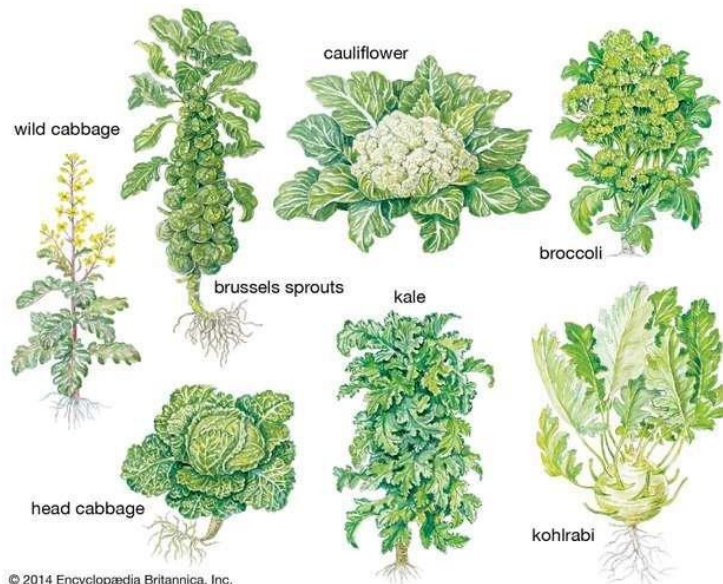
Az első kísérlet során *in vitro* módszerrel szeretnénk felszaporítani különböző genotípusú növényeket, fertőződés elkerülésével.

A második kísérletben embrió mentés módszerével felnevelt magoncokat mikroszaporítjuk, majd leveleket gyűjtünk róluk DNS vizsgálat céljából. A levelek leválasztása után túl gyengék lesznek a növények, és elvesztenénk fontos genotípusokat, ezért minden levél leválasztás után tovább mikroszaporítjuk a növényeket. A levelekből PCR tesztet tervezünk elvégezni, majd ezután egy agaróz gélelektroforézis segítségével szelekciót végzünk el.

1 Irodalmi áttekintés

1.1 Káposztafélék bemutatása

A már évezredek óta termesztett káposztafélék a kifejezetten fontos zöldségnövényeink csoportjába sorolhatók, amik közül a vadkáposzta (*Brassica oleracea* L.) különböző változatait (virágát, szárát, levelét) őseink már fogyasztottak, vagy takarmányként használták fel. Darwin párhuzamot tudott húzni a természetes szelekciós elméletével, és a ténnyel, hogy a káposztának, mint fajnak, rengeteg változata van jelen (Makenzie E. et al 2021). Az 1. ábrán megfigyelhető, hogy hosszú kiválogatódás, azaz a domesztikáció során kialakult változatok milyen sokféle megjelenésűek, úgy mint, például: brokkoli (*var. italica*), karfiol (*var. botrytis*), fodroskel (*var. acephala*), karalábé (*B. oleracea convar. acephala var. gongylodes*), fejeskáposzta (*B. oleracea convar. capitata var. alba*), vöröskáposzta (*B. oleracea convar. capitata var. rubra*), kelkáposzta (*B. oleracea convar. capitata var. sabauda*), bimbóskel (*B. oleracea convar. oleracea var. gemmifera*). A *Brassica oleracea* faj $2n=18$ kromoszómával rendelkezik, ezt „C” genomnak is nevezik a *Brassica* nemzetségben (Elaine C. et al 2002).



1. Ábra - *Brassica oleracea* változatok (Ștefan, Ioana & Ona, Andreea 2020)

1.1.1 A káposzta (*Brassica oleracea*) bemutatása

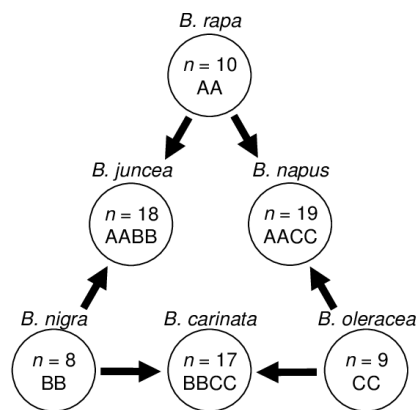
A *Brassica oleracea* a Földközi-tenger keleti partvidékéről, Kis-Ázsiából származik. A káposzta egy kétéves növény, ami az első évében egy nagy méretű csúcsrügyet fejleszt, ami emberi fogyasztásra alkalmas, második évben a javorizációs impulzus hatására magszárat hoz. Így generatív szaporítása hosszabb időt vesz igénybe. A *B. oleracea* gyökere a talaj felső 30 cm-ét átszövő oldalgökerekből, és szerteágazó gyökérszövetből áll, mely 120 cm mélyre is lehatol. Szára az első évben rövid 25-30 cm magasra nő, elágazásokat nem hoz. Szára két részből áll, egy hosszabb külső torzsából és egy fejből folytatódó torzsából. Második évben a virágszára 120 cm magasra is megnő. Az első évben az első megjelenő levelek hosszabbak a földre hajolnak, a később képződők pedig rövidebbek, szélesebbek, és egymásra lapulnak. A folyamatosan növekvő levelek mutatják a növény fejlődését. Virágzata fürt, a bibék beporzása rovarok segítségével történik a virágzása akár 50 napig is tarthat. Becő termése van, 1-2 mm nagyságú sötétbarna magvakkal, amik 4-5 évig őrizik csírázókéességüket. (Pék Z. 2007)

1.1.2 *Brassica oleracea* emberi szervezetre gyakorolt hatása

Emberi táplálkozás szempontjából is fontos növény a *Brassica oleracea*. A tradicionális orvoslásban is fontos szerepet képviselt, a Görögök, Rómaiak, és az Egyiptomiak is ismerték, a levének székletlazító hatását. Ellenszerként használták gombamérgezésnél, gyomornyálkahártya gyulladás esetén, a fejfájás csillapítására, napszúrás és nátha enyhítésére. Az Európai népgyógyászatban torokfájás, ízületi fájdalmak, és melankólia kezelésére is használták. (Stefan I, Ona A. 2020)

1.1.3 *Brassica rapa* jellemzése

A vadrepce (*Brassica rapa* L.) az egyik legősibb tagja a *Brassicaceae* családnak, és az első egyede, amit domesztikáltak az emberek. A hetvenes évekig a fő élelmiszer ipari és szabadföldi olajnövény a vadrepce volt, majd később a termesztésbe vont rokon fajai vették át a vezető szerepet (káposztarepce (*Brassica napus*), és a barna repce (*Brassica juncea*). A termesztésből nem szorult ki teljesen, mai napig termesztik kisebb területeken Európában, Indiában. Ígéretes növény, jó hőstressz tűrése miatt és rövid tenyészidője alatt, magas olajhozamot tud előállítani. A természetes allopoliploid káposztarepce (*Brassica napus*) (AACC) és a barna mustár (*Brassica juncea*) (AABB) egyik diploid szülőjeként szereplő növény a vadrepce (*Brassica rapa* L.) AA genommal. A *Brassica* fajok között húzódó kapcsolatot bemutatja a 2. ábra (U. 1935). A hat fajnak három eltérő diploid genomja van. A *Brassica napus*, a *B. juncea* és a *B. carinata* a természetben előforduló tetraploidok. (Wang X. 2011).



2. Ábra - *Brassica rapa* genetikája (U. 1935)

1.2 In vitro szövettenyésztés

1.2.1 Hajtástenyészetek bemutatása

A hajtástenyésztés gyökér nélküli hajtások nevelését jelenti táptalajon, kontrollált körülmények között. Esszenciális része, hogy a hajtások normális növekedését éri el, serkentsék azt. A legstabilabb klónozási technika, mert nincs, de-, és redifferenciálódás, azaz kalluszfázis. A mikroszaporítás és *in vitro* génbank legáltalánosabb szaporítási módszere, mind kertészeti, és mind erdészeti fajok között. Fontosabb nemzetségek, ahol sikerrel használják ezt a módszert: *Dianthus*, *Gerbera*, *Phlox*, *Allium*, stb. Járulékos hajtástenyészetek abban térnek el a klasszikustól, hogy a regenerálódás nem az eredeti

inokulumokra alapoz, hanem azokból fejlődött kalluszosokra. 3 szakaszra tagolható: járulékos hajtáscsúcs differenciálódásának indukációja, annak fejlődése, és multiplikációja, végül azok gyökereztetése. A szaporítás járulékos hajtásokkal, oldalhajtásokkal, és többrügyes hajtásdarabbal történik. A genetikai változásnak nagyobb az esélye, mert a kalluszosodás során fejlődő sejtek genetikailag instabilak. (Heszky L. 2005).

1.2.2 Szövettenyésztés sterilizálása

A szövettenyésztés legfontosabb pillére a steril környezet. Nem elég az eszközöket sterilizálni, a növény felületét is muszáj. A steril levegő, a jól fertőtlenített táptalaj, növényi felület, és pontos munkával egy mikroorganizmusoktól mentes rendszert hozhatunk létre. (Hegedűs Á. 2005). Az *in vitro* kultúrák alapfeltétele a steril környezet fenntartása munka közben. Az eszközöket fém fóliába csomagolva, a nevelőedényeket egy kuktába rakva 25 percig forraljuk, ezzel sterilizálva őket. A magas hő és nyomás denaturalizál minden fehérjét, így egy baktérium, gomba és vírus se marad a felületükön (Aadil M., Abuzar M. 2023). A nem megfelelő sterilizálás, a nevelőedény sérülése, vagy a növények táptalajra helyezésekor kerülhetnek a baktériumok, vagy gombák a rendszerbe. Vannak esetek, amikor a mikroorganizmusok latensek maradnak a növény szöveteiben, és csak később jelentkeznek a tünetek. Ezek lehetnek lassú növekedés, nekrozis, vagy klorózis. Ízeltlábúak bejuthatnak a tenyészetekbe a tenyészetek friss táptalajra helyezéseik (passzálás) között, nem jól záródó fedők alá bújva, vagy átrágnak a polipropilén fóliát. Testükön hordozva mikroorganizmusokkal fertőzhetik be a táptalajt. Ilyen tenyészetekben is lehet alkalmazni antibiotikumokat, vagy fungicideket (Tóth E. 2005). Passzálások után bekerült mikroorganizmusok a növényanyagot, vagy a táptalajt fogyasztják, és miután túlnövik a növényt, elpusztítják azt a többlet tápanyagot fogyasztva. Ezek az organizmusok okozzák a „haló” effektust, amikor egy fehér kör jelentkezik a táptalajon a növény körül. Ezért fontos a felületi sterilizálás, bár nincs egy általános módszer, az irodalom azt mutatja, hogy klórtartalmú fertőtlenítő szert használnak erre a célra. 70%-os alkohol (etanol) is megfelel a célra, viszont a 96%-os nem, mert nagyobb mértékben dehidratálja a sejteket. Nátrium-hipokloritot (NaOCl), és kalcium-hipokloritot (Ca(OCl)_2) is használhatunk felületi fertőtlenítésre. A 20. század végén elterjedt lett a magyar laboratóriumokban, hogy higany-kloridot (HgCl_2) használnak, bár ez erős mérgező, így alapos előkészületet vont maga után. Fertőtlenítés során sok növényi szövet pusztul el, így a kiválasztott növényi részt csak a szárítás után,

steril fülkében vágjuk a kívánt méretre, és helyezzük a táptalajra (Hegedűs Á. 2005). Az endogén baktériumok felismerése fontos, mert felborulhat az éves rotáció, és a kísérletek eredménytelenek lesznek. Fontos lenne felismerni őket, alak, szín, anaerob jellege és a Gram festés reakcióban adott információból. Így a laboroknak könnyebb lenne dönteni az antibiotikum használatba vételéről. A növényekbe bejuthatnak ez a baktériumok a gyökérszőrökön, sebeken, a légzőnyílásokon keresztül a párás levegő miatt. A gond, hogy amíg életfeltételeik teljesülnek a növényben, addig nem jellenek meg míg nem érintkeznek a táptalajjal. Előfordul, hogyha magas citokinin tartalommal kezeljük a tenyészetet, és a passzálások között több idő telik el, az életfeltételeik megváltoznak, és megjelennek az idősebb kultúrákban. Az észlelés pillanata kulcsfontosságú, ha még csak fátyolos elszíneződést észlelünk, még tudjuk kezelni a problémát. Ilyenkor érdemes az egész kultúrát kezelés alá vonni, akkor is, ha több száz növényről van szó, ha abbahagyjuk a kezelést, újra megjelenhetnek a baktériumok. Folyamatos kezelés során rezisztencia alakul ki, nagy koncentráció esetén fitotoxikus hatást vált ki (Hegedűs Á. 2005). A mag, levél, termés, szár és a hajtások különböző protokollt kívánnak maguk után sterilizálás során. A fertőtlenítés három részből áll: előkezelés, sterilizálás, utókezelés. A magokat húsz-harminc percig 10%-os nátrium-hipoklorit oldatba tesszük. Utókezelésnél háromszor átmoszuk steril vízben, majd steril szűrőpapíron csíráztatjuk. Gyümölcsök esetén is 96%-os etanolt használunk rövid ideig, majd 10 percig 2%-os NaOCl oldatban mosva sterilizáljuk. Utókezelése többszöri steril vizes atmoszással történik, utána a magvakat kipreparáljuk. Hajtásdarabokat vízzel lemossuk, majd rövid 96%-os etanos öblítést alkalmazunk. Öt-harminc perc 2%-os NaOCl kezelést követően átmoszuk háromszor steril vízzel, végüket levágjuk, és függőlegesen táptalajra helyezzük. A raktározószerveket folyóvízzel letisztítjuk, 20-30 percig 2%-os NaOCl oldatban mossuk, majd háromszor átöblítjük steril vízzel, és szűrőpapíron szárítjuk. Leveleknél egyből a sterilizálást végezzük el. Egy percig 0,1%-os higany-kloridba ($HgCl_2$) bemártani, majd többszörös sterilvizes atmoszással kezeljük, és szűrőpapírra helyezzük. (Yeomann, M.M., Macleod A.J. 1977).

1.2.3 Táptalajt alkotó elemek

1.2.3.1 Makro- és mikro tápanyagok fontossága

A táptalajban található makro-, és mikroelemek a közeg szervesetlen alkotóelemei (Jámborné B. E. 2005). Kezdetekben nem tartalmazott a táptalaj mást, csak

makroelemeket, mikroelemeket szennyeződésként tartalmazhatott, mint például a Knudson KC táptalaj. Máig ezt a táptalajt használják orchidea magoncok csíráztatásához (Eszéki E. 2012). A fejlődés párhuzamot mutatott a folyamatos sókoncentráció növekedésben a táptalajokban, és egyre több táptalaj recept született meg. 1962-ben Murashige és Skoog megalkottak egy táptalajt dohánykallusz tenyésztéshez (MS táptalaj), aminek kimagaslóan magas volt a sókoncentrációja, sokan ezt túl magas koncentrációnak gondolták és a makroelemek mennyiségét a felére csökkentették. (Jámborné B. E. 2005). Az MS táptalaj kiegészítéseként hozzáadott indolsav és kinetin négy, ötszörös biomassza hozamot eredményezett. Amikor növényi szöveteket vizsgálatáról van szó, figyelembe kell venni, hogy a nagy növekedést sokféle anyag okozhatja, így, hogy minimalizálják a különféle anyagok ráhatását a fejlődésre, elő kellett állni egy közeggel, amiben csak az alapvető tápanyagok találhatóak meg, így a növekedésben, és a hozamban semmilyen változás ne forduljon elő. Megsokszorozva a szervetlen, és szerves anyagokat, hatalmas fejlődést értek el, ezért is látható a receptben a kiemelkedően magas sótartalom. (Toshio M., Folke S. 1962). A vas problémát okozott a különféle vassók kicsapódása miatt, de később ezt szerves vaskomplexekkel oldották meg (Fe-EDTA). Régóta ismerjük a mikroelemek élettani szerepét, és fontosságukat steril kultúrákban. Analitikailag a legtisztább sókat használjuk már az *in vitro* tenyészetekben (Jámborné Benczúr E. 2005).

Fontos a talajnak beállítani a megfelelő pH-t. Értéke általában 5,5-5,6, viszont autoklávozás során ez az érték 0,5-tel csökkenhet. A tenyészidő múlásával a táptalaj lúgosodik, de általában a hetes (semleges) érték fele tart. A szélsőséges pH a sejtosztódást gátolja, és nekrozishoz vezet (Jámborné Benczúr E. 2005).

1.2.3.2 Szénhidrátok

Szénhidrátok esetében legtöbbször szacharózt, de van, hogy egyszerűbb cukrokat; fruktózt, vagy glükózt választanak. Fás növények érzékenyebbek a cukorra. Mennyiséget befolyásolja a faj, fajta, a növekedési fázis, más makro-, és mikroelemek, illetve növekedésszabályozó anyagok jelenléte. Az organogenezis folyamatában kulcsfontosságúak, mert a szükséges energiát, és a sejtek építővázát adják a cukrok. Míg hajtások megnyúlásához kevesebb energia szükséges, addig a gyökérbővízítés rengeteg energiát igényel, nem csak energiaforrás, de az ozmotikus hatásokat is befolyásolja. A

cukor az antocián képzést is befolyásolja. A természetesen piros növények többsége megfelelő cukorellátás mellett *in vitro* is pirosak. Vannak esetek amikor az elszíneződés a túladagolásra hívja fel a figyelmet (Jámborné Benczúr E. 2005).

1.2.3.3 Nitrogén

Szerves nitrogénforrásra csak ritka esetekben van szüksége a tenyészeteknek. Kivételt képeznek a merisztématenyészetek és az orchidea magvak csíráztatása. Az utóbbi esetében azért van, mert ezek az inokulumok olyan aprók, hogy önálló fehérjeszintézisre nem képesek szerves nitrogén sókból (Jámborné Benczúr E. 2005).

1.2.3.4 Agar-agar

A táptalaj szilárdításához használhatunk agart, ami tengeri vörösmoszatból készül. Mikroszaporításnál Agar-Agart használunk, másik nevén szálal agar. Tömegszaporításhoz tökéletes mert ez a legolcsóbb opció, és jó a minősége is, viszont nem szabvány alapján készül, így minőségben eltérhet, ezzel befolyásolva a növények fejlődését. Az agar helyettesítésére kifejlesztették a Gelrite nevű anyagot. 1984-ben állították elő, és azóta egyre több laborban használják. Egy természetes heteropoliszacharid, ami por állapotban fehér, táptalajként teljesen áttetsző, az enzimátikus folyamatoknak ellenáll, és a szilárdító képessége kétszerese az agaréhoz képest. Hátránya, hogy nagyon drága, így az agarral keverve használjuk 1:3 arányban. Nem ajánlott a Gelrite használata vitrifikiációra hajlamos kultúráknál (Jámborné Benczúr E. 2005).

1.2.3.5 Vitaminok szerepe

A vitaminoknak jelentős hatása van az életben maradáshoz, és a növekedés elősegítéséhez. A növényi szövetek bizonyos vitaminokat képesek szintetizálni, de igénylik az exogén adagolást. A teljes növény minden vitamint képes előállítani, viszont minél kisebb növényi részt veszünk figyelembe a szövettenyészetben, annál kevesebb a szintetizált vitaminok mennyisége. A B vitamin csoport tagjai serkentik a növekedést leginkább. Ezek a B₁-, B₃-, B₆- vitaminok; thiamin, nikotinsav és piridoxin. A vitaminok hatása függ a pH-tól, hőmérséklettől, és a sókoncentrációtól. Linsmaier és Skoog (1965) a nikotinsavat és a piridoxint nem találta hasznosnak. Majd az MS táptalaj vitaminjainak száma négyről, kettőre redukálódott: a thiaminra és a myo-inozitolra. Attól független,

hogy a myo-inozitol növényi vitaminként van besorolva, vannak kutatók, akik „pót” szénhidrátként sorolnák be, nem vesz részt sem ozmotikumként, sem energiaforrásként a szénhidrátok felhasználása során (Geert Jan K. 2007). Skivin és Chu (1978) őszibarack hajtáscsúcsok szaporításához használt egy 12 komponensből álló vitamin receptet, amiben magas C-vitamin (50mg/l) koncentrációt használtak, valószínűleg antioxidánsként. Miller és kollégái (1982) is nagy mennyiségű C-vitamint alkalmaztak az őszibarack hajtáscsúcs tenyészetükben. Receptjük nem vált be, magas riboflavin tartalma miatt, mert ez a vitamin gátolja a gyökeresedést. Chinoy 1984-ben írt egy könyvet a C-vitamin pozitív hatásairól a növény növekedésére, fotoszintézisére, metabolizmusára. A redox folyamatokban fontos szerepe van, elektron donorként van jelen. Legnagyobb koncentrációban a kloroplasztiszokban található meg. A mennyisége és a növekedés korrelál, ajánlott mennyiség felett a növekedés lassul (Jámborné Benczúr E. 2005).

1.2.3.6 Növekedést szabályozó anyagok

A növekedés szabályozó anyagok élettani hatással bírnak a növényekre, ezzel gátolva, vagy támogatva a növekedésüket. Ide tartoznak az auxinok, citokininek, gibbelerinek. Ezek mennyisége, minősége, más szabályozók jelenléte vagy hiánya indukálhat genetikai-fiziológiai változásokat. Első nagy előrehaladás a szövettenyészetekben az indol-ecetsav (3-IAA) felfedezése volt, ami a növényekben egy endogén auxin. Ezt a táptalajhoz adva, folyamatosan növekvő kallusztényeszeteket tudtak létre hozni. További fejlődés volt a mesterséges és további természetes auxinok felfedezése. Fontosabb mesterséges auxinok a naftil-ecetsav (NAA), indolil-vajsav (IBA), és a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2,4-D). Az indol-ecetsav, és az indolil-vajsav fény hatására bomlik, így kevesebb mennyiséget tud felhasználni a növény, mint szeretnénk. A 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, és a naftil-ecetsav stabilak, fény hatására nem bomlanak le. Legfontosabb szerepük a gyökérképződésben, és a sejtek megnyúlásában jelentkezik. Különféle kultúrák, más-más mennyiséget igényelnek, növényeknek van valamelyest endogén auxin szintetizációs képességük. Hatásukat a koncentráció határozza meg, túllépve az adott növényi rész tűrőképességét, gátló hatásba fordul át ez a hatás. Az auxinok hatása függ a más növekedés szabályozó anyagok jelenlététől, így hatásmechanizmusuk eléggé bonyolult (Jámborné B.E. 2005).

Másik fontos előrelépés volt a citokininek felfedezése. Ez a hormoncsoport a sejt differenciálódásban, sejtosztódásban, rejuvenilizációban, és az apikális dominancia kialakításában játszik szerepet. Fontos endogén citokininek a zeatin és az izopentnil-

adenin (2iP). Mesterséges citokininek a kinetin (KIN), N⁶-benzil-adenin (BA), N⁶-tetrahidropiranyl-benzil-adenin (PBA). Fásszárú növényeknek BA-t használunk, míg lágyszárúaknál kinetint. Szövettenyésztésben először Skoog és Miller (1957) fedezte fel, hogy a citokininek és auxinok együttes használatával a kallusztényészetekben megindult a merisztéma képződés. Ma már a kalluszkultúrák indukciójához és fenntartásához is együttesen használják az auxinokat, és a citokinineket. A citokininek bomlástermékeinek is van citokinin hatásuk, bár ez gyengébb, mint az alap vegyületé. A hormonarányok döntik el, hogy kalluszosodás történik, vagy szerv-differenciálódás indul el. Magas citokinin, alacsony auxin aránynál a hajtáscsúcs differenciálódás indul meg fokozott xylem képződéssel. Magas auxin, alacsony citokinin aránynál, a gyökér-tenyészőcsúcs differenciálódik. Magas auxin és citokinin együttes jelenlétében kalluszképződés indul (Jámborné Benczúr E. 2005).

A gibberelinek hasonló megnyúló növekedést eredményeznek, mint az auxinok. Fás növények szövettenyésztésében használják juvenilitás céljából. Az aktív rügy nyugalmat megtörhetjük vele (Jámborné Benczúr E. 2005).

Sok más növekedésszabályozó anyagot ismerünk még. Az abszcizinsav (ABA) gátló hatású hormon. Az etilén gátolja a morfogenezist, és a sejtosztódást, elősegíti a sejtek öregedését. A trijód-benzoésav (TIBA) az auxin mozgását gátolja, a kalluszképződéssel együtt. Ancymidol gátolja a gibberelinszintézist, a hajtások rövidülnek, rügyek kipattognak a jelenlétében. A paclobutrazol szintén gátolja a gibberelinszintézist, de a gyökérdifferenciálódást elősegíti, az akklimatizációt megkönnyíti. A phloroglucinol antioxidáns hatású, vitrifikáció megelőzésére használják, segíti a gyökérdifferenciálódást, és megfigyelték antibakteriális hatását is (Jámborné Benczúr E. 2005).

1.3 Molekuláris technikák

1.3.1 A dezoxiribonukleinsav jellemzése

A nukleinsavak 3 komponensből épülnek fel. Egy foszforsavból, egy öt szénatamos cukorból és egy nitrogénbázisból. A DNS-ben 2-dezoxi-D-ribóz cukor található, míg az RNS-ben D-ribóz. A nitrogénbázisokból öt darab van: adenin, guanin, uracil, timin, citozin. A DNS-ben adenin, guanin, citozin, és timin van, míg az RNS-ben uracil van a timin helyett. A nukleozidoknak nevezzük a glikozidkötéssel összekötött cukor és bázis molekulát. Azokat a nukleozid molekulákat, amelyekhez észteres kötéssel kapcsolódik a

foszforsav, mononukleotidnak nevezzük. Polinukleotidok akkor jönnek létre amikor a molekulák cukor foszfát kovalens kötással összekapcsolódnak. A bázisok oldalláncként kapcsolódnak pentóz egységenként, ez adja a primer szerkezetét a molekulának. A DNS és az RNS primer szerkezete megegyezik, viszont lényeges különbség a szekunder szerkezeténél jelentkezik, ami jelentősen meghatározza őket. A DNS egy kettős hélix térszerkezettel rendelkezik. A molekula váza két spirálisan jobbra elcsavarodott lánc alkotja, amelyek polárisak. A két lánc egymásra párhuzamos, viszont ellentétes irányba futnak közös tengelyű vonal mentén. A polinukleotid láncok oldalát cukor-foszforsav lánc alkotja, míg a bázisok befelé fordulva hidrogénhid kötással kapcsolódnak egymáshoz. A hidrogénhid kötés egy gyengébb kémiai kötés, viszont nagy mennyiségben előfordulva erős kapcsolat alakul ki a láncok között. Az energetikai feltételek, a rendelkezésre álló hely a két spirál között, és a bázisok szerkezete miatt, ezek a molekulák kapcsolódása szabályszerű. A kisebb térfogatú pirimidinbázisok (timin, uracil) mindig a nagy térfogatú purinbázisokhoz (adenin, guanin, citozin) kapcsolódnak. Az adenin mindig a timinhez, a citozin a guaninhez. Így a két lánc komplementer, az egyik bázisrendje meghatározza a másikat (Heszky L. 2008).

1.3.2 Marker alapú szelekció

A nemesítés legfőbb célja, hogy a gazdaságilag és agronómiaailag fontos tulajdonságokat javítsuk. Első lépésként mindig a különböző tulajdonságú szülőket keresztezzük, az egyik szülő lehet vad faj genotípusa is. A gazdaságilag értéktelen tulajdonságoktól visszakeresztezés módszerével tudunk megválni. A fenotípuson alapuló szelekció ezen esetben sem nem idő, se nem költség hatékony, ezeken felül precíz módszerekre, és jól elkülönülő tulajdonságokra van szükség a szelekció során. A marker alapú szelekciónál viszont, genotípus alapján válogatjuk ki a számunkra hasznos génnel rendelkező növényeket. Szelektálhatunk kódoló DNS szakaszra, vagy génnel szoros szorosan kapcsolt markerrel. Ezen a szelekció során markereket alkalmazunk az azonosításra, így a fenotípust a génnel kapcsolt nem kódoló DNS szakaszok alapján jósoljuk előre. Ez a módszer segít csökkenteni a visszakeresztezésre szánt időt, és a hasadó populációkban való szelekcióban is segít. A nem ismert gén szekvencia se okoz gondot, mert a DNS markerre történik a szelekció, és a marker szoros kapcsolatban áll a gazdaságilag hasznos génekkel (Kiss E. 1999).

1.3.3 A PCR bemutatása

A polimeráz láncreakció során felszaporítjuk a keresett DNS egy szakaszát szabad szemmel látható mennyiségűre. A reakció során ciklikusan ismétlődik három szakasz. Az első során a DNS két láncát szétválasztjuk, ezt hívjuk denaturálásnak. A második során a keresett szakaszhoz komplementer szekvenciákat, primereket kapcsolunk a homológ részekhez. A harmadik szakasz az elongáció, ahol az indító primerek elkezdik a komplementer szál szintézisét, ezzel meghosszabbítva a láncot. A reakció során exponenciálisan nő a DNS mennyisége, általában 35-40 ciklusra van szükség, hogy elérjük az elégedő mennyiségű dezoxiribonukleinsav szakasz mennyiségét. Fontos, hogy a denaturáció során a DNS-polimeráz enzim aktív maradjon a magas hőhatás ellenére is, hogy a 35 ciklust végre tudja hajtani. A reakcióelegynek tartalmaznia kell a polimeráz enzimet, az azt aktiváló puffert, $MgCl_2$ -ot, a primereket, a négy nukleotidot, és a felszaporítani kívánt DNS templátot. Agaróz-gélelektroforézissel méretük szerint szétválasztjuk felszaporodott DNS szakaszokat, és etidium-bromiddal megfestve, ultraibolya fényben a keresett terméket azonosítjuk (Kiss E. 1999).

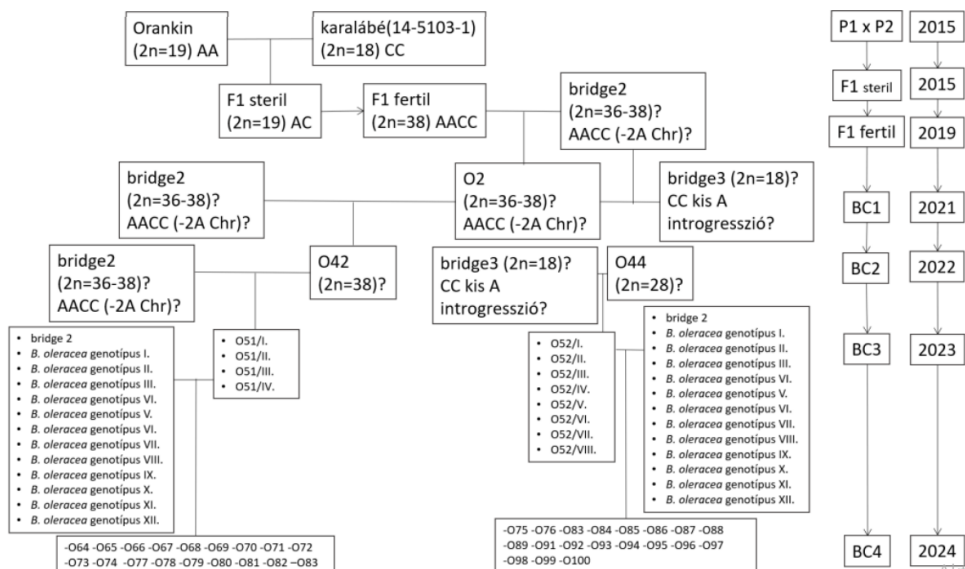
1.3.4 Agaróz-gélelektroforézis

Ezt a technikát különböző méretű nukleinsavak szétválasztására és vizualizálására alkalmazzuk. A gél pórusmérete dönti el, hogy milyen molekulákat tudunk elválasztani benne. Kisebb molekuláknál alkalmazhatjuk a PAGE módszert, de DNS-sel való munkánál akadályba ütközünk, mert ezek a molekulák több ezer bázis párból is állhatnak, így a leghígabb poliakrilamid gélben sem tudjuk őket elválasztani. Megoldást nyújt erre, ha nagyobb pórusméretű anyagot használunk célunk eléréséhez; az agaróz gél. A vörös moszatok sejtfalából készült poliszacharid, galaktóz és anhidro-galaktózból áll. Az agaróz gél térhálós szerkezetét összetartó másodlagos kötések miatt a gél, magas hőfokon folyékony halmazállapotot vesz fel. Előállítás egyszerű, összekeverjük a pufferrel, majd magas hőmérséklettel feloldjuk a szemcséket és a megfelelő formába öntve hagyjuk lehűlni. A gél pórusmérete függ a koncentrációjától. Előnye azonos az akrilamid gélével, hidrofil, kémiaiilag inert, stabil, nem köt meg olyan színyanyagokat, amiket a elemezni kívánt anyag festésére használunk. Nukleinsavak festésénél olyan festéket használunk, amelynek a nukleinsavakkal alkotott komplexe UV fényvel gerjeszthető, látható tartományban bocsát ki fényt, azaz fluoreszkál. A DNS kimutatására gyakran alkalmazott festék az etidium-bromid. Egy gyűrűs vegyület, amely képes a kétszálú DNS molekula

szálai közé beférkőzni. Az etídium-bromid mutagénnek számít, megzavarhatja a replikáció során a DNS polimeráz működését, ezért érdemes egy nem mutagén festéket alkalmazni (Venekei, Molnár & Porrogi, 2015).

1.4 Narancssárga belső levelű káposzta fajta nemesítés folyamata

Dr. Galli Zsolt káposzta nemesítő célja az volt, hogy a *B. rapa* eredetű CRTISO1 gént bevigye a fejeskáposztába. Ez a mutáns fehérje gátolja a lipopinnak az átalakulását össz-transz-likopinná, így prolikopin raktározás elindul a levelekben (Mitsuru et al. 2011). Az F1 növény steril volt, viszont spontán kromoszómakétszereződés során fertilissé vált. A nemesítés bridge növények bevonásával folytatódott, aminek folyamata az 3. ábrán látható (Tóth-Lencsés A. K. et al. 2024).



3. Ábra - A mutáns CRTISO1 gén bevitelének keresztezési sémája, Dr. Galli Zsolt munkája (Tóth-Lencsés A. K. et al. 2024)

Az F1 hibrid és a további BC egyedek mindegyike embrió mentés segítségével volt felnevelhető, aminek oka a kromoszómaszám eltérésre vezethető vissza. Rendelkezőnk egy molekuláris markerrel (BraOR primerpár), ami a narancs gén DNS alapú kimutatását teszi lehetővé (Lee S. et al. 2014). A BC4 egyedek már különböző korai fejeskáposztákkal lettek visszakeresztelve. (3. ábra)

2 Anyag és módszer

2.1 Növényanyag

A növényanyagot az 1. táblázat tartalmazza. A növények *in vitro* fenntartása és tárolása a MATE Szent István Campus gödöllői telephelyén történt, a Molekuláris genetika és nemesítés csoport fényszobájában.

1. táblázat - A kísérlet növényanyaga

1.	O44	12.	O91 (03 27) II.	23.	O96 (03 12) I.
2.	Bridge 1	13.	O93 (03 27) I.	24.	O96 (03 12) III.
3.	Bridge 2	14.	O93 (03 27) II.	25.	O96 (03 12) IV.
4.	Bridge 3	15.	O94 (03 12) I.	26.	O96 (03 12) V.
5.	O2 self	16.	O94 (03 12) II.	27.	
6.	O52 fehér	17.	O94 (03 12) III.	28.	
7.	O52 narancs	18.	O94 (03 12) VI.	29.	
8.	O83 (03 05) I.	19.	O94 (03 12) V.	30.	
9.	O83 (03 05) II.	20.	O94 (03 12) VI.	31.	
10.	O83 (03 27) III.	21.	O94 (03 12) VII.	32.	
11.	O91 (03 27) I.	22.	O94 (03 12) XIII.	33.	

Egyes növényeket számkódokkal láttuk el, ami a következő kód alapján értelmezhető: O= Nemesítési cél: *B. rapa* eredetű narancs gén bevitele fejeskáposztába. Arab szám az „O” betűt követően = keresztezési kód, ami adott anyai és apai genotípusokat, azaz szülőket foglal magába. Zárójelben feltüntetett dátum = a becő/k beérkezése a laboratóriumba, majd a benne lévő magok táptalajra helyezésének dátuma. Római számok = magoncok, amikből növény fejlődött (minden növény egyedi genotípus).

2.2 In vitro kísérlet

2.2.1 Táptalaj készítése

A növényeket MS táptalajon neveltük, aminek komponenseit a 2. táblázat, törzsoldatainak mennyiségét a táptalaj készítéskor a 3. táblázat tartalmazza. Egyes esetekben hormon kiegészítést is adtunk a táptalajhoz mert ez egy olyan táptalaj, amely szinte minden növénynek megfelelő mennyiségű tápanyagot tartalmaz, a sikeres mikroszaporítás érdekében növekedést serkentő hormonokat is alkalmaztunk, mint például: indol-vajsav, 1-naftil-ecetsav.

2. táblázat - Komponensek mennyiségei

Makroelem összetétel (1000ml)		
Töménység	1x	10x
KNO ₃	1,9 g	19 g
NH ₄ NO ₃	1,65 g	16,5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,37 g	3,7 g
KH ₂ PO ₄	0,17 g	1,7 g
Mezoelem összetétel (1000ml)		
Töménység	1x	200x
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,0278 g	5,56 g
Na-EDTA	0,0373 g	7,46 g
Mikroelem összetétel (1000 ml)		
Töménység	1x	1000x
MnSO ₄ *H ₂ O	0,0223 g	22,30 g
ZnSO ₄ *H ₂ O	0,0086 g	8,60 g
H ₃ BO ₃	0,0062 g	6,20 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,00025 g	0,25 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,000025 g	0,025 g
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,000025 g	0,025 g
Vitamin összetétel (1000 ml)		
Töménység	1x	1000x
Thiamine, B1	0,0001 g	0,10 g
Nicot.acd, B3	0,0005 g	0,50 g
Pyridoxine, B6	0,0001 g	0,10 g
Glycine	0,002 g	2,00 g
Szaharóz	20 g (MS táptalaj esetében 30g)	
Inozitol	0,1 g	
Agar	8 g	
Indol-3-vajsav	0,2 mg/l	

3. táblázat - Törzsoldat mennyiségek

		1l	500ml	250ml	125ml
Makro	10x	100 ml	50 ml	25 ml	12,5 ml
Mezo	200x	5 ml	2,5 ml	1,25 ml	625 µl
Mikro	1000x	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	125 µl
CaCl ₂	200x	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	125 µl
KI	1000x	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	125 µl
Vitamin	1000x	1 ml	0,5 ml	0,25 ml	125 µl
Inozit		0,1 g	50 µl	25 µl	12,5 µl
Cukor		30 g	15 g	7,5 g	3,75 g
Agar		8 g	4 g	2 g	1 g

Az táptalaj elkészítésekor egy Erlenmeyer lombikba kimérjük a talaj törzsoldatait attól függően milyen mennyiségben szeretnénk táptalajt készíteni: makro, mezo, mikro, CaCl₂, KI, vitaminok. Ezek után az inozitolt, és a cukrot adjuk az oldathoz, és egy mágneses keverő segítségével oldódásig keverjük. Az agar hozzáadása előtt a pH szintet 5,8-as értékre kell állítani HCL, és NaOH oldatok adagolásával. A pH beállításánál figyeljünk, hogy az elektróda nem sérül meg a folyamatos keverés miatt. Gyengébb vagy kis mennyiségű növényanyag esetében használtunk indol-vajsavat, vagy 1-naftil-ecetsavat a növények sikeres mikroszaporításának érdekében. Ezek után alumínium fóliával lefedjük a lombikot, majd 20 percen keresztül főzzük egy kuktában. Az idő lejártával levesszük a kuktát, és megvárjuk míg a nyomáskülönbség elmúlik, mert, ha a fedőt túl hamar távolítjuk el, ledobhatja az alumínium fedelünk, így a külső kórokozótól védtelen lesz az elegy, és később a kórokozók felszaporodhatnak a táptalajban. A lombikot kivesszük a kuktából, ügyelve arra, hogy annak hőmérséklete égési sérülést okozhat számunkra. Amíg hagyjuk hűlni az elegyet előkészítjük a fülkét. Bekapcsoljuk a légáram keringtetést, és az UV világítást 15 percig. Miután lejárt az idő, lekapcsoljuk a lámpát, detergensel fertőtlenítyük a fülkét, majd a kikészített csipeszeket és szikéket is áttöröljük. Az előre sterilizált petricsészéket, vagy lombikokat behelyezzük a fülkébe. Ezeknek a lombikoknak a teteje rendelkezik alumínium fedéllel, ezeket eltávolítjuk úgy,

hogy kezünk ne kerüljön a lombikok fölé, mert ez is fertőzés forrás lehet. Az Erlenmeyer lombikból ezek után áttöltjük a táptalajt, folyamatos figyelmet fordítva a steril munkára.

2.2.2 Mikroszaporítás

A táptalaj megszilárdulása után megkezdhetjük a mikroszaporítást. A csipeszt és a szikét etanolba mártjuk majd a gázégővel leégetjük a biztos sterilitás érdekében, ezt 3-4 növényként megismételjük. Először a hajtásokat feldaraboltam, majd petricsészébe öntött táptalajra helyeztem, kis méretük miatt nagy mennyiségű növényanyagot tudtam produkálni minden genotípusnál. A növényeket egy 21°C-os fényszobában tartottuk 16 óra világos, majd sötét 4000LUX megvilágításban. Az egészséges, nem elfertőződött szárrészeket kiválogattuk a petricsészéből, az oldalhajtást hozó szárrészekről leválasztottam a hajtást steril szike és csipesz segítségével leválasztottuk, majd MS táptalajt tartalmazó fiolába, vagy befőttesüvegbe helyeztük őket, majd parafilmmel lezártuk, és 21°C-os fényszobába helyeztük, 16 óra világos és 8 óra sötét 4000 LUX megvilágításba. A fiolában nem elfertőződött egészséges növényeket szelektáltuk, és befőttesüvegbe helyeztük, ami MS táptalajt tartalmazott, a nagyobb hely végett, hogy a növények jobban érezzék magukat. Ezután 21°C-os fényszobába helyeztük őket, 16 óra világos és 8 óra 4000LUX megvilágítással.

Munkám második részében a magkezdeményekből fejlődő fiatal *in vitro* növényeket vizsgáltam, amik akklimatizálása és szabadföldre történő kiültetése előtt leveleket gyűjtöttünk róluk szelekció céljából, így mikroszaporítást igényeltek. A magoncok leveleinek begyűjtését követően a hajtásukat levágtuk, és MS táptalajba szűrtük, majd 21°C-os fényszobába helyeztük, 16 óra világos és 8 óra sötét 4000 LUX megvilágításba.

A növényeket hetente ellenőriztem, található-e fertőzés, megfigyelhető-e növekedés, gyökérvégződés. Az elfertőződött, elpusztult növényeket szelektáltuk folyamat során.

2.3 Genotipizálás

2.3.1 A DNS izolálás

In vitro körülmények között nevelt növényekről leveleket szedtünk (1. táblázat 14. mintától a 30. mintáig). A DNS kivonást a növények leveléből Macherey Nagel® NucleoSpin DNS kit segítségével végeztük a gyártó által megadott protokoll, valamint a Genetika és Genomika Tanszék tapasztalatai alapján.

1. A protokoll lépései: 0.1 g minta homogenizálása mozsárban folyékony nitrogén segítségével
2. A homogenizált minta eppendorf csőbe helyezése
 - 400 µl PL1 puffer hozzáadása
 - Vortex
 - 10 µl RNáz hozzáadása
 - Vortex
 - Inkubálás: 65 °C, 10 min
 - Vortex
 - Centrifuga: 5 min, 11.000 x g (Tanszéki tapasztalat alapján)
 - Minta áttöltése 2 ml-es eppendorf csőbe helyezett lila NucleoSpin® oszlopba (szűrő)
 - Centrifuga: 2 min, 11.000 x g
 - Lila oszlop eldobása
3. 400 µl PC puffer hozzáadása
 - Vortex: 30 sec
4. Zöld NucleoSpin® oszlop (szilika gél membrán) új 2 ml-es eppendorf csőbe helyezése
 - 600 µl minta oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
5. Szilika-membrán mosása és szárítása
 - 400 µl PW1 puffer Oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
 - 600 µl PW2 puffer oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása

- 300 µl PW2 puffer oszlopba pipettázása
- Centrifuga: 2 min, 11.000 x g
- Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
- Centrifuga üresen: 2 min, 11.000 x g (Tanszéki tapasztalat alapján)

6. Oszlop új 1.5 ml-es eppendorf csőbe helyezése

- 50 µl PE puffer oszlopba pipettázása
- Inkubálás: 65 °C, 5 min
- Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
- Átfolyt minta megtartása
- 6-os pont lépéseinek megismétlése a PE puffer pipettázásától

7. A DNS minta tisztaságát és koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük.

2.3.2 PCR reakció

2.3.2.1 Primerek szekvenciája

Annak megállapítására, hogy a vizsgált növények hordozzák-e a számunkra fontos kínai kel eredetű narancssárga színéért felelős mutáns CRTISO1 gént a Bra-OR primerpár volt a segítségünkre, aminek szekvenciáját a 4.táblázat tartalmazza.

4. táblázat - Bra-OR primerpárok szekvenciái

Primer	Primer pár	Szekvencia	(Zhang et al. 2008)
Bra-OR	Bra-OR- Forward	5'- GAGGTCTGTTTCTACGAGTACGG -3'	(Zhang et al. 2008)
	Bra-OR- Reverz	5'- CTCATTAGTCCATCTCCGACCA -3'	(Zhang et al. 2008)

2.3.3 PCR körülmények

2.3.3.1 Touchdown-pcr

A BraOR gén megtalálásához Touchdown pcr-t használtunk a növényanyagon. A polimeráz enzim, és a PCR mastermix mennyiségek 5. táblázatban látható.

5. táblázat: PCR Mastermix összetevők

Összetevő	Mennyiség (μl)
Desztillált víz	3,65
5x puffer	2
25 mM MgCl ₂	0,5
2 mM dNTP	0,3
10 μM reverse primer	0,75
10 μM forward primer	0,75
5 μg/μl Taq polimeráz	0,05

A Bra-OR, 70 °C-os Touchdown PCR-t alkalmazva az alábbiak szerint:

1. Előciklus: 94 °C, 2 perc ('hot start')
2. 10 cikluson keresztül a következő lépések, amely során az annealing hőmérséklete ciklusonként 0.5 °C-kal csökken:
 - Denaturálás: 94 °C, 30 másodperc,
 - Annealing: 70 °C, 30 másodperc,
 - Szintézis: 72 °C, 1 perc,
3. 24 cikluson keresztül a következő lépések:
 - Denaturálás: 94 °C, 30 másodperc,
 - Annealing: 70 °C, 30 másodperc,
 - Szintézis: 72 °C, 1 perc,
4. Utópolimerizáció: 72 °C, 5 perc.

2.3.4 Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakciók során felszaporított fragmentumok vizuális detektálásához 1%-os agaróz gél és etídium-bromid interkalálódó festéket használtunk.

Az agaróz gél öntés lépései:

1. Összetevők kimérése: 120 ml 0,5 x TBE puffer, 1,2 g agaróz,
2. A pufferhez hozzáadjuk az agarózt, majd mikrohullámú sütőben a homogén állapot eléréséig melegítjük
3. Folyóvíz alatt visszahűtjük folyamatos mozgítás mellett,
4. 6 µl etídium-bromid hozzáadása a folyékony gélhez, majd keverés
5. az előkészített, tiszta tálcába öntjük a gél, a keletkező buborékokat pipetta hegygel eltávolítjuk.

A zsebek kialakításához a fésűt a gél szélével párhuzamosan, kb. 1 cm távolságra igazítottuk a még folyékony gélbe (8. ábra). A már kihűlt és megszilárdult gél futtatókádba helyeztük el.

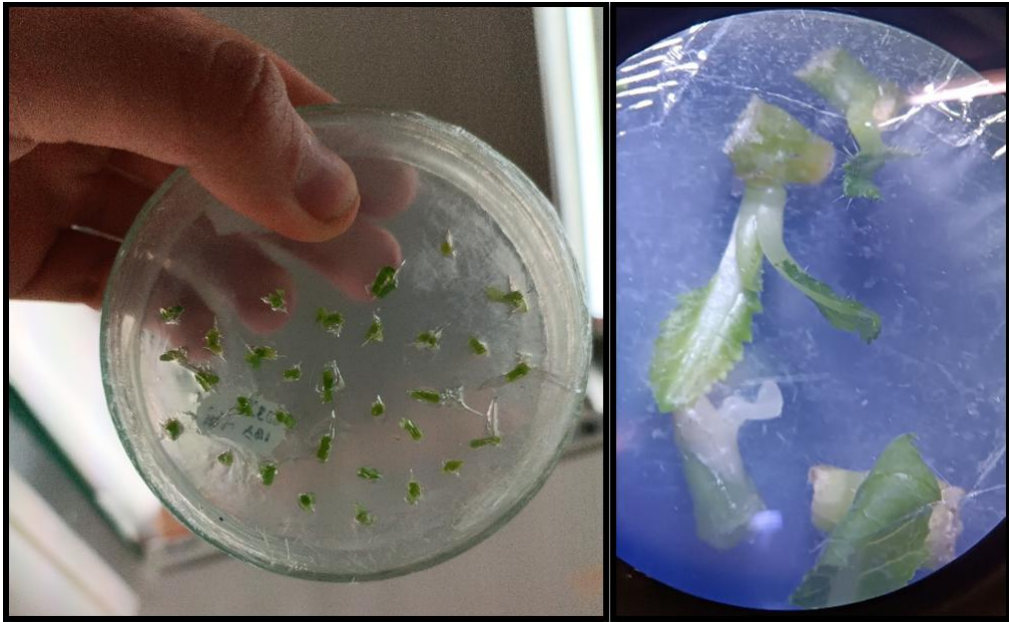
Molekulatömeg markerként GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder (Thermo Fisher) szolgált.

Az elektroforetikus eljárás 90 V-on 40 percig tartott a 0,5x TBE pufferben a BIO RAD™ Power Pac 300 elektroforézis tápegység használatával

A futtatást követően a detektált fragmentumok kiértékelésére az Alpha Innotech Multimage™ Light Cabinet gédokumentációs készülékkel történt, amely egy elzárt fülkében UV megvilágítással gerjeszti a fragmentumokban interkalálódott festéket, valamint fénykép is készíthető a gélről.

3 Eredmények

A kísérletem során 26 növény mikroszaporítását végeztük el a laboratóriumban, amik két részre oszthatóak. Az első esetben az 1. táblázat 1.-7-ig szereplő növények vettek részt a kísérletben. A cél, a növények *in vitro* klónjainak az előállítása volt, ugyanis ezeken a növényeken gyökércsúcs kiindulásából terveztünk kromoszóma számlálást végezni egy másik kísérlet keretein belül. A növények szárát átlagosan 25-30 részre vágtam genotípusokként steril körülmények között, majd MS táptalajt tartalmazó petricsészébe raktam (4.ábra). Amely szárrészek fejlődésnek indultak azokról a hajtásokat levágtam, majd befőttesüvegbe vittem tovább őket, amik MS táptalajt tartalmaztak. Egy befőttesüvegbe 7-8 növényt tudtam áthelyezni (5, 6, 7 ábra)



4. Ábra - O52 narancs genotípus eredményei



5. **Ábra** - O52 narancs genotípus befőttesüvegbe helyezve



6. **Ábra** - O2 self növény felszaporításának eredménye befőttesüvegben



7. **Ábra** - O52 fehér genotípus felszaporítása befőttesüvegben

A növényegyedek felszaporítása mind a 7 esetben (O2 self, O44, Bridge 1, Bridge 2, Bridge 3, O52 narancs, O52 fehér (1. táblázat)) sikeresek voltak, így minden egyed, ami a befőttesüvegben nevelkedett egészséges gyökeret tudott fejleszteni, így elegendő gyökércsúcsot tudott szolgáltatni a tervezett kísérlethez. A felszaporítás során elenyésző elfertőződést tapasztaltunk.

A munkánk második részében, az 1. táblázatban található 8-26-os számú növények szerepelnek a vizsgálatainkban. Ezek a narancs belső levelű káposzta nemesítéséből származó laborba érkezett becők magkezdeményeikből fejlődő fiatal *in vitro* növények voltak. Azok akklimatizálásuk és szabadföldre történő kiültetésük előtt leveleket gyűjtöttünk róluk szelekció céljából, így mikroszaporítást igényeltek. A magoncok leveleinek begyűjtését követően a hajtásukat levágtuk, és fiolákba töltött MS táptalajban figyeltük fejlődésüket, amit a 8. ábra mutat. A 8. ábrán láthatjuk „A” jelöléssel az O83

as-, „B” jelöléssel a O91-es-, C jelöléssel az O96-os-, D jelöléssel az O94-es keresztezésből származó növényeket.



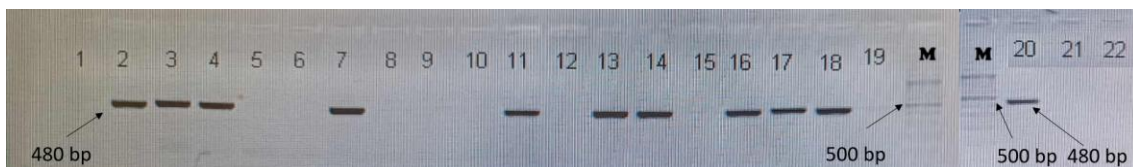
8. Ábra - Fiolában nevelt növények (saját kép). „A” jelöléssel az O83 as-, „B” jelöléssel a O91-es-, C jelöléssel az O96-os-, D jelöléssel az O94-es keresztezésből származó növényeket.

A következő kísérlet a növények gondozásáról szólt. A 9.ábrán látható, hogy a növényeket egy hónapos időintervallum után tovább vittük kisebb befőttesüvegekbe a további növekedés érdekében. Minden kísérletünk sikeres volt, a gyökérfejlődés megfelelő mértékben történt, fertőződést nem tapasztaltunk.



9. Ábra - Befőttesüvegbe ültetett növények (saját fotó). „A” jelöléssel az O83 as-, „B” jelöléssel a O91-es-, C jelöléssel az O96-os-, D jelöléssel az O94-es keresztezésből származó növényeket.

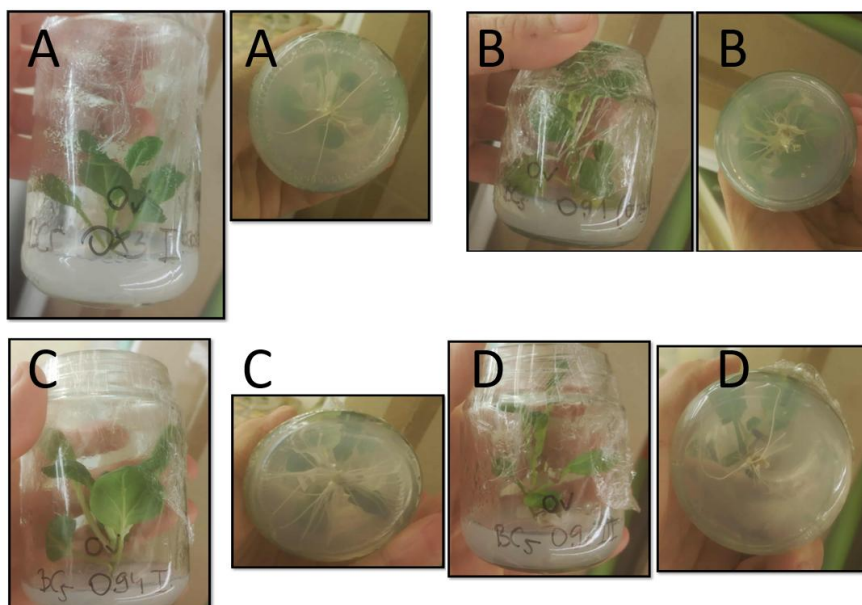
Szintén ezen a növényanyagon marker alapú szelekciót végeztünk el a BraOR primer segítségével, ami egy 480bp méretű DNS szakaszt szaporít fel a narancs gén megléte esetén a genotípusban. A PCR reakció eredménye az 10. ábrán látható. A PCR vizsgálatokhoz a DNS-t a levelekből Macherey Nagel® NucleoSpin DNS kit-tel izoláltuk a 21 BC hibrid esetén (1. táblázat 8-26-ig), és kontrollként használtuk a káposzta, Orankin, és F1 genotípusokat. Azért ez a három növény volt a kontroll, mert a káposzta nem hordozta a narancs gént, az orankin narancs gént homozigótaként hordozza, az F1 heterozigótaként hordozza a narancs gént. A vizsgálatunk eredményeit a 10. ábra szemlélteti.



10. Ábra - 1%-os EtBr festett agaróz gél eredménye BraOR primerpárral. Minták sorrendje: 1. káposzta, 2. Orankin, 3. F1, 4. O83 (03 05) I., 5. O83 (03 05) II., 6. O83 (03 27) III., 7. O91 (03 27) I., 8. O91 (03 27) II., 9. O93 (03 27) I., 10. O93 (03 27) II., 11. O94 (03 12) I. 12. O94 (03 12) II., 13. O94 (03 12) III., 14. O94 (03 12) IV., 15. O94 (03 12) V., 16. O94 (03 12) VI., 17. O94 (03 12) VII., 18. O94 (03 12) XIII., 19. O96 (03 12) I., 20. O96 (03 12) III. 21. O96 (03 12) IV. 22. O96 (03 12) V. M: Molekulatömeg marker

A kontroll minta közül kettőben megfigyelhető a 480 bp méretű DNS szakasz, ami a narancs gén jelenlétét is jelenti. Az 1. minta a káposzta, negatív eredményt adott, a 2. az Orankin volt, tőle származik a narancs gén, a 3. az F1 heterozigótaként tartalmazza a narancs gént. A vizsgált 19 minta közül 9 tartalmazza a keresett gént, nevezetesen a 4. O83 (03 05) I., 7. O91 (03 27) I., 11. O94 (03 12) I., 13. O94 (03 12) III., 14. O94 (03 12) IV., 16. O94 (03 12) VI., 17. O94 (03 12) VII., 18. O94 (03 12) XIII., 20. O96 (03 12) III. A vizsgálatot 2x ismételtük meg, azok azonos eredményt produkáltak.

A növényanyag 4 értékelhető csoportot tartalmazott (az O93-as keresztezésből származó 2 magonc egyike sem hordozta a narancs gént). Ez a négy csoport az O83, O91, O94, O96 volt. Az O83-as csoportban 3 magonc közül 1 hordozta a narancs gént. Az O91-es csoportban is 2 magoncból 1 hordozta. Az O94-es csoportban már 8 magoncból 4db hordozta, míg az O96-os csoportnak 4 magoncából 3 tagja hordozta a narancs gént. Az O83-as csoportban 1 magonc nem élte túl a többi kisebb gyökeret növesztett. Az O91-es csoportban szintén nem élte túl 1 növény, itt is kisebb gyökérfejlődés látszott. Az O94, és O96-os csoportban minden magonc túlélte, és szép dús gyökeret nevelt. A 11. ábrán látható A: O83 I, B: O91 I., C: O94 I., D: O96 III. növényeket kiválasztottuk, és akklimatizálásra küldtünk a Syngenta ócsai telephelyére.



11. **Ábra:** Akklimatizálásra küldött növények (saját fotó)

Összefoglalás

A kutatásunk két részből állt, mindkettőnél kulcsfontosságú szerepet játszott a mikroszaporítás. Legfontosabb része a mikroszaporításnak a sterilitás, a belső rendszer kórokozó mentessége. Minden petricsésze, befőttesüveg és munkaeszköz sterilizáláson esik át mielőtt dolgoznánk vele. Fontos része a szaporításnak a táptalaj készítés, hiszen a megfelelő növekedéshez elengedhetetlen a pontos anyagmennyiségek biztosítása. Ügyelnünk kellett, hogy ne legyen tápanyaghiányos egy növény se, és a túlادagolásra is figyelmet kellett fordítani. A megfelelő táptalaj pH elengedhetetlen, hiszen a tápanyagfelvétel és a növények élete múlik rajta. Miután a megfelelő anyagmennyiségű táptalajt elkészítjük, a steril üvegekbe kell öntenünk azt. Itt is fennáll a fertőzés veszélye, hiába sterilizáljuk az egész fülkét, majd a kezünket, amint az üveg fölé kerül kezünk, a fertőzés veszélye megugrik. Ezek után a szikék és csipeszek fertőtlenítése következik, amivel feldaraboljuk a növényeket. A precíz munka itt a legfontosabb, és a legnehezebb. A kutatás első és második szakaszában is elenyésző fertőződést tapasztaltunk, így a mikroszaporítás sikeresnek tekinthető.

A sikeres felszaporítás után az első szakaszban a növények gyökércsúcsát gyűjtöttük be egy későbbi kísérlethez.

A kutatásunk második részében felnevelt magoncokat kellett mikroszaporítanom. A megfelelő méretű magoncokról leveleket gyűjtöttünk a későbbi DNS vizsgálathoz. Miután leveleket gyűjtöttünk a növényekről, újabb növényt kellett nevelnünk mikroszaporítással, mert a levelei nélkül nem élte volna túl a növény az akklimatizációt.

A kutatás során marker alapú szelekciót is végeztünk, hogy gyorsabban haladjon a folyamat. Segítségünkre volt a BraOR primerpár, hogy azonosítani tudjuk majd a számunkra szükséges gén jelenlétét.

A vizsgált 19 minta közül 9 tartalmazza a keresett gént, nevezetesen a 4. O83 (03 05) I., 7. O91 (03 27) I., 11. O94 (03 12) I., 13. O94 (03 12) III., 14. O94 (03 12) IV., 16. O94 (03 12) VI., 17. O94 (03 12) VII., 18. O94 (03 12) XIII., 20. O96 (03 12) III.

A növényanyag 4 csoportot tartalmazott (az O93-as keresztezésből származó 2 magonc egyike sem hordozta a narancs gént). Az O83, O91, O94, O96. Az O83-as csoportban 3 magonc közül 1 hordozta a narancs gént. Az O91-es csoportban is 2 magoncból 1 hordozta. Az O94-es csoportban már 8 magoncból 4db hordozta, míg az

O96-os csoportnak 4 magoncából 3 tagja hordozta a narancs gént. Az O83-as csoportban 1 magonc nem élte túl a többi kisebb gyökeret növesztett. Az O91-es csoportban szintén nem élte túl 1 növény, itt is kisebb gyökérfejlődés látszott. Az O94, és O96-os csoportban minden magonc túlélte, és szép dús gyökeret nevelt. Négy növényt (A: O83 I, B: O91 I., C: O94 I., D: O96 III.) kiválasztottuk, és akklimatizálásra küldtünk a Syngenta ócsai telephelyére.

Irodalomjegyzék:

- [1] Aadil, Mohd & Abuzar, Mohd & Subharti Medical College, Department Of. (2023). *Role of Sterilization in Microbiology Laboratory*.
- [2] Chinoy, N.J. (1984). *The Role of Ascorbic Acid in Growth, Differentiation and Metabolism of Plants*. Martinus Nijhoff / Dr. W. Junk Publisher, The Hague / Boston / Lancaster.
- [3] Eszéki, E. (2012). *Orchideafajok génmegőrzési és szaporítási lehetőségei*. Budapest, Kertészettudományi Doktori Iskola. https://phd.lib.uni-corvinus.hu/703/1/Eszei_Eszter.pdf
- [4] Geert Jan de Klerk. *The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems*.
- [5] Heszky, László, Fésüs, László, & Hornok, László. (2005). *Mezőgazdasági Biotechnológia*. In: **In vitro klónozás biotechnikai és alkalmazásuk**. AGROINFORM Kiadó és Nyomda, pp. 140.
- [6] Heszky, László, Fésüs, László, & Hornok, László. (2005). *Mezőgazdasági Biotechnológia*. In: **Szomatikus sejtgenetika és géntechnológia**. AGROINFORM Kiadó és Nyomda, pp. 174–175.
- [7] Howell, E.C., Barker, G.C., Jones, G.H., Kearsey, M.J., King, G.J., Kop, E.P., Ryder, C.D., Teakle, G.R., Vicente, J.G., & Armstrong, S.J. (2002). *Integration of the Cytogenetic and Genetic Linkage Maps of Brassica oleracea*.
- [8] Inismaier, E.M., & Skoog, F. (1965). *Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant.* 18: 100–127.
- [9] Jámborné Benczúr, E. (2005). *In vitro növények esetében alkalmazható diagnosztikai eljárások*. In: Jámborné B.E. (szerk.), **Kertészeti növények mikroszaporítása: in vitro növényklónozás**. Budapest, Mezőgazda Kiadó, pp. 112–115.
- [10] Margherita, B., Dario, B., & Oierre, D. (1998). *Influence of agar on in vitro cultures: I. Physicochemical properties of agar and agar gelled media*.
- [11] Miller, G.A., Coston, D.C., Denny, E.G., & Romeo, M.E. (1982). *In vitro propagation of 'Nemaguard' peach rootstock*. *HortSci.* 17: 194.
- [12] Mun, J.H., Kwon, S.J., Seol, Y.J. *et al.* (2010). *Sequence and structure of Brassica rapa chromosome*.
- [13] Pavlović, S., Vinterhalter, B., Mitić, N., Adžić, S., Pavlović, N., Zdravković, M., & Vinterhalter, D. *In vitro shoot regeneration from seedling explants in Brassica vegetables: red cabbage, broccoli, savoy cabbage and cauliflower*.

- [14] Pék, Zoltán. (2007). *Fejeskáposzta*. In: Csorbainé G.A., Diményi J., Helyes L., Ombódi A., & Pék Z. (szerk.) **Zöldségtermesztés**. Gödöllő, Szent István Egyetem, Nyomda és Könyvesbolt, pp. 185–187.
- [15] Ștefan, Ioana & Ona, Andreea. (2020). *Cabbage (Brassica oleracea L.). Overview of the Health Benefits and Therapeutical Uses*.
- [16] Skoog, F., & Miller, C.O. (1957). *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118–131.
- [17] Skirvin, R.M., & Chu, M.C. (1978). *Tissue culture of peach shoot tips*. Hort. Sci. 13: 349.
- [18] U, N. (1935). *Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization*. Japanese Journal of Botany, 7: 389–452.
- [19] *Producing inter-specific hybrids between Brassica juncea (L.) Czern & Coss and B. oleracea (L.) to synthesize trigonemic (abc) Brassica – Scientific Figure on ResearchGate*. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Us-Triangle-of-Brassica-species-U-1935_fig3_270056803
- [20] Wang, X., Wang, H. et al. (2011). *The genome of the mesopolyploid crop species Brassica rapa*.
- [21] Poór K. (2023). *Marker alapú szelekció a narancssárga fejeskáposzta előállításában*
- [22] Ștefan, Ioana & Ona, Andreea. (2020). *Cabbage (Brassica oleracea L.). Overview of the Health Benefits and Therapeutical Uses*.
- [23] Venekei, I. – Molnár, T. – Porrogi, P. (2015): *Biokémia. Gyakorlati jegyzet*. Összeállította: Dr. Venekei István, Molnár Tamás, Porrogi Pálma. Lektorálta: Szilágyi László. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Budapest. TÁMOP 4.1.2.B.2-13/1-2013-0007.
- [24] Gupta, S. K., Pratap, A. (2007) History, origin and evolution. *Advances in botanical research-rapeseed breeding*. Springer. Berlin. 464, 1–20. p.
- [25] Tóth-Lencsés A. Kitti, Tari Erika Anett, Czinege Dóra, Kiss Erzsébet, Szőke Antal, Pance Álmos Miklós, Polgári Dávid és Galli Zsolt, *Narancssárga belső levelű fejeskáposzta előállítása B. rapa eredetű mutáns CRTISO1 génre alapozva embriómentés módszerével*, MATE Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Gödöllő, intézményi publikáció
- [26] Donaldson, M. S. (2004): Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3:19
- [27] Kiss Erzsébet (1999), *Növényi molekuláris genetika I.*, In: Kiss Erzsébet (szerk.) **Növényi genom szerveződése**, Gödöllő, Szent István Egyetemi Kiadó. 5. p.

- [28] Dr. Heszky László, Dr. Galli Zsolt (2008), *A genetika alapjai*, In: Dr. Vida Gábor, Dr. Pauk János (szerk.) **A DNS genetikája**, Gödöllő. Szent István Egyetemi Kiadó. 38-40. pp.
- [29] Zhang F., Wang G., Wang M., Liu X., Zhao X., Yu Y., Zhang D., Yu S. (2008): *Identification of SCAR markers linked to or, a gene inducing beta-carotene accumulation in Chinese cabbage*, *Euphytica*, 164., 463–471. p.
- [30] Mitsuru W, Keiichi M., Jun A. (2011): *Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage*, *LWT-Food Science and Technology*, 44., 1971-1975p.

Ábrák jegyzéke

1. Ábra - <i>Brassica oleracea</i> változatok (Ştefan, Ioana & Ona, Andreea 2020) ...	7
2. Ábra - <i>Brassica rapa</i> genetikája (U. 1935).....	9
3. Ábra - A mutáns CRTISO1 gén bevitelének keresztezési sémája (Tóth-Lencsés A. K. et al. 2024).....	18
4. Ábra - O52 narancs genotípus eredményei.....	28
5. Ábra - O52 narancs genotípus befőttesüvegbe helyezve	29
6. Ábra - O2 self növény felszaporításának eredménye befőttesüvegben	29
7. Ábra - O52 fehér genotípus felszaporítása befőttesüvegben	30
8. Ábra - Fiolában nevelt növények (saját kép). „A” jelöléssel az O83 as-, „B” jelöléssel a O91-es-, C jelöléssel az O96-os-, D jelöléssel az O94-es keresztezésből származó növényeket.....	31
9. Ábra - Befőttesüvegbe ültetett növények (saját fotó). „A” jelöléssel az O83 as-, „B” jelöléssel a O91-es-, C jelöléssel az O96-os-, D jelöléssel az O94-es keresztezésből származó növényeket.....	32
10. Ábra - 1%-os EtBr festett primerpár. Minták sorrendje: 1. káposzta, 2. Orankin, 3. F1, 4. O83 (03 05) I., 5. O83 (03 05) II., 6. O83 (03 05) III., 7. O91 (03 05) I., 8. O91 (03 05) II., 9. O94 (03 12) I., 10. O94 (03 12) II., 11. O94 (03 12) III. 12. O94 (03 12) IV., 13. O94 (03 12) V., 14. O94 (03 12) VI., 15. O94 (03 12) VII., 16. O94 (03 12) VIII., 17. O96 (03 12) I., 18. O96 (03 12) III., 19. O96 (03 12) IV., 20. O96 (03 12) V.....	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat - A kísérlet növényanyaga.....	19
2. táblázat - Komponensek mennyiségei	21
3. táblázat - Törzsoldat mennyiségek	22
4. táblázat - Bra-OR primerpárok szekvenciái.....	25

Nyilatkozatok

NYILATKOZAT

Kelemen Máté Róbert (név) (hallgató Neptun azonosítója: ZW P/L#)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a
záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót¹ áttekinttem, 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: 2025 év 11 hó 03 nap

Polle - R. K. K. K.

belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.

MATE Szervezeti és Működési Szabályzat

III. Hallgatói Követelményrendszer

III.1. Tanulmányi és Vizsgaszabályzat

6.13. sz. függelék: A MATE egységes szakdolgozat / diplomadolgozat / záródolgozat / portfólió készítési útmutatója

4.2. sz. melléklete: Nyilatkozat a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről (módosítva: 2025. október 16.)

NYILATKOZAT

szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kelemen Máté Richárd
A Hallgató Neptun kódja: ZWPILH
A dolgozat címe: Biotechnológiai módszerek alkalmazása káposztafélék nemesítési alpanyagán
A megjelenés éve: 2025
A konzulens intézetének neve: Genetika és Biotechnológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Genetika és Genomika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlanul állítottam, 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 könyvtári repozitóri rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitóri rendszerében.

Kelt: 2025 év 11 hó 02 nap


Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	Kelemen Máté Richárd
Neptun-kódja:	ZWPILH
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	<input checked="" type="checkbox"/> BSc/BA <input type="checkbox"/> MSc/MA <input type="checkbox"/> Doktori (PhD) <input type="checkbox"/> Egyéb:
Tantárgy neve/kódja*:	
A munka címe:	Biotechnológiai módszerek alkalmazása káposztafélék nemesítési alapanyagán

* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, töltsse ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztens vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrekció, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott eszköz verziója, elérhetősége	MI-neve,	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

.....

.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: GÖDÖLLŐ 2025. 11 hó 03. nap

.....
Kálmán Natálie Richárd

Hallgató aláírása

.....
Néki-R. A. Lili

Konzulens/Témavezető aláírása