

SZAKDOLGOZAT

Becző Abigél

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Növénytermesztési-tudományok Intézet

Mezőgazdasági mérnöki alapképzési szak

**TORTUOUS INTERNODE (TTI) MUTÁNS PAPRIKA VONAL IN VITRO
ANALÍZISE, MIKROSZAPORÍTÁSI KÍSÉRLETE**

Belső konzulens: Pápai Bánk

PhD hallgató

Belső konzulens: Dr. Veres Anikó

egyetemi docens

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:**

Genetika és

Biotechnológia Intézet,
Genetika és

Genomika Tanszék

Készítette:

Becző Abigél

Gödöllő

2023

TARTALOM

1. Bevezetés és célkitűzés	3
2. Szakirodalmi áttekintés	4
2.1 A paprika növény	4
2.1.1 Eredete	4
2.1.2 Rendszertani és morfológiai jellemzők	4
2.1.3 Gazdasági jelentőség	5
2.1.4 Paprika nemesítés Magyarországon	8
2.1.5 Paprika mutánsok	9
2.2 Megnyúlt internódiumú, csavarodó szárú mutánsok	10
2.3 <i>In vitro</i> mikroszaporítás	11
2.3.1 Története	11
2.3.2 Alapjai	11
2.3.3 Alkalmazás jelentősége paprika esetében	12
2.4 Növényi hormon mechanizmusok	13
2.4.1. Auxinok	13
2.4.2. Citokininek	14
2.4.3. Gibberellinek	14
3. Anyag és módszer	16
3.1 A Tortuous internode mutáns paprika	16
3.2 Murashige-Skoog táptalaj	16
3.4 Körülmények	18
3.4.1 Sterilitás	18
3.4.2 Fitotron és növényszoba	18
3.5 <i>In vitro</i> csíráztatás	19
3.6 A növényi explantumok előkészítése, azok táptalajra helyezése	20
4. Eredmények és értékelésük	22
4.1 <i>In vitro</i> csíráztatás	22
4.2 <i>tti</i> és kontroll növények explantumainak összehasonlítása MS táptalajon	23
4.3 A BAP hormon kezelés eredményei	24

4.4 <i>tti</i> regenerátumok mikroszaporításának további lépései	26
4.5 Akklimatizációs fázis	28
5. Következtetések és javaslatok	30
6. Összefoglalás	32
7.Köszönetnyilvánítás	34
8.Irodalomjegyzék	35
9.Ábrák jegyzéke	40
10.Függelékek	41

1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban a mezőgazdaság merőben eltér attól, ami az emberiség hajnalán volt; míg elődeink még a túlélésért művelték földjeiket, a fejlődő országok kivételével, a mai gazdálkodók már inkább haszonszerzés céljából foglalkoznak agrár tevékenységgel. Egy tényező mindenképpen megmaradt az évezredek során: növénynemesítésre folyamatosan szükség van a termés mennyiségének, valamint minőségének javítása érdekében, hogy felvegyük a versenyt a változó klímával, illetve a folyamatosan növekvő népességgel is. Ebben a folyamatban pedig fontos szerepe van a véletlenszerűen létrejövő mutáns egyedeknek, melyeket előnyös tulajdonságaik miatt sokszor kereszteznek, tovább szaporítanak, új fajtákat hoznak velük létre. Munkám során egy különleges mutáns paprika vonal vizsgálatát tűztem ki célul, melynek jellegzetessége a megnyúlt, elfekvő, enyhén csavarodó szár. Paprika növény esetében a korábbi kísérletek során nem voltak megvalósíthatóak különleges termesztési módok, mint például a vertikális termesztés sem. Kísérleti növényünk alkalmasnak bizonyulhat egy ilyen speciális termesztésre, ám ennek elengedhetetlen része, hogy jobban megismerjük a mutáns tulajdonság hátterét. Vizsgálatom tárgya ez a különleges tulajdonság volt, egészen pontosan az, hogy mi a magyarázata a megváltozott fenotípusnak. A megnyúlt internódiumok miatt a gibberelin hormonháztartás megváltozását feltételeztem. Mivel kevés mag állt rendelkezésre, célom az volt, hogy *in vitro* mikroszaporítással nagyszámú azonos genotípusú egyedet kapjak, amikkel már vizsgálni tudom a hormon egyensúly megváltozását. Ennek a felderítésére *in vitro* vizsgálatokat alkalmaztam. Választásom azért esett az *in vitro* módszerekre, mert egyrészt a vizsgált növény esetében ez a legcélravezetőbb, könnyen megfigyelhető az eredménye, másrészt viszonylag rövid idő alatt nagy mennyiségű vizsgálható állományt tudtam előállítani. Célom az volt, hogy kiderítsem a különböző hormonok jelenlétében megtartja-e elfekvő tulajdonságát a *Tortuous internode*, vagy visszatér az alapértelmezett függőleges növekedéshez.

2. Szakirodalmi áttekintés

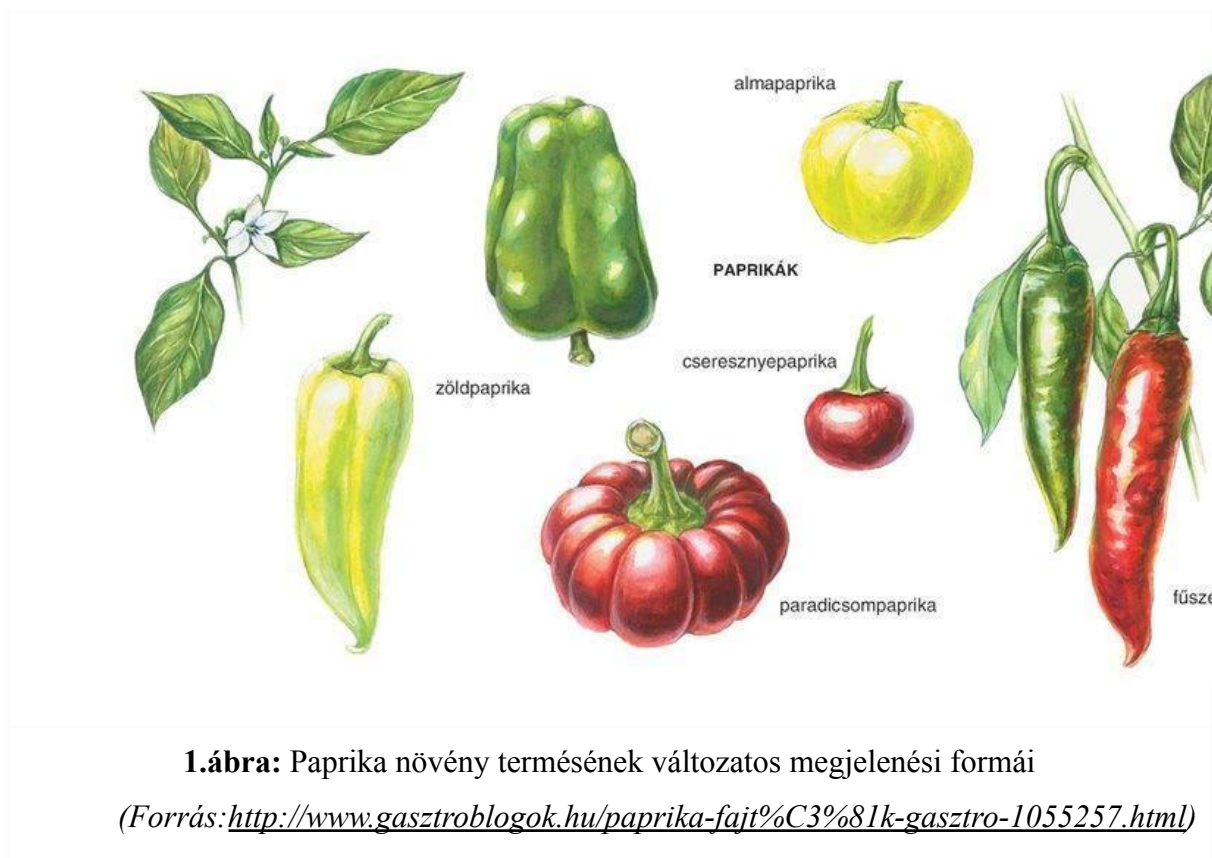
2.1 A paprika növény

2.1.1 Eredete

De Candolle (1894) kutatásai Dél-Amerika trópusi vidékeire helyezik a *Capsicum* nemzetség gécetrumát, tehát ez az a térség, ahol a vad paprika fajok a legnagyobb számban és diverzitásban megtalálhatóak. A helyi őslakosok több száz éve használták gyógyászati célokra (Jones & Rosa, 1928), illetve a velük kereskedő kínaiak is alkalmazták a hagyományos orvoslásban. A vadpaprikát, termesztésbe vont növényünk őst, Dél-Amerikában találták meg, míg a fűszerpaprika őst Mexikóban. Amerika meghódítása után a többi kontinensen is elterjedt, hazánkba csak a XVI. század elején került török közvetítéssel (innen ered a hagyományos “török bors” elnevezés), elterjedésről azonban csak a XVIII. században beszélhetünk. Az úgynevezett bolgárkertészet keretein belül lendült fel a hazai étkezési paprika nemesítése, illetve termesztése. (Menyhárt, 2021)

2.1.2 Rendszertani és morfológiai jellemzők

A zárvatermő, kétszikű növények között a *Solanaceae* (Burgonyafélék) családban találjuk meg a paprikák nemzetségét (*Capsicum*). Jellemzőjük a diarch gyökérzet, orsógyökerekből egyenletesen két szemközti sorban nőnek a mellékgyökerek, bojtra hasonlító formát létrehozva. Vízszintes irányban akár fél méter sugárban is megtalálhatóak a gyökerek, esetenként 60 cm mélyre is lehatolhatnak. A kifejlett növény hajtásrendszere alul fűrtös, felül bogas elágazású (csúcsban kettős vagy többesbog). Termesztett fajtáinkat folytonos növekedésű és csokros (determinált) alakokra csoportosíthatjuk. Bár a paprika lágyszárú növény, a tenyészidő előrehaladtával szára felfelé fásul. (Lantos,2018) A levelek mérete és alakja fajra jellemző, azonban elmondható, hogy általában tojás vagy lándzsa alakú, sima, ép szélű, rövid levélnyelű. Szórt vagy átellenes állásúak is lehetnek. A paprika virágai egylakiak, váltivarúak és öntermékenyülők. Egyesével, ágvillában nőnek, színük lehet fehér, sárga, lila. Az étkezési paprika felfűjt bogyótermést fejleszt, míg a fűszer és chili fajták toktermést. A termés zöld, piros, sárga, akár lila árnyalatokat vehet fel (Arimboor et al., 2015), alakja is változatos megjelenésű lehet, a hogy az 1. ábra mutatja.



2.1.3 Gazdasági jelentőség

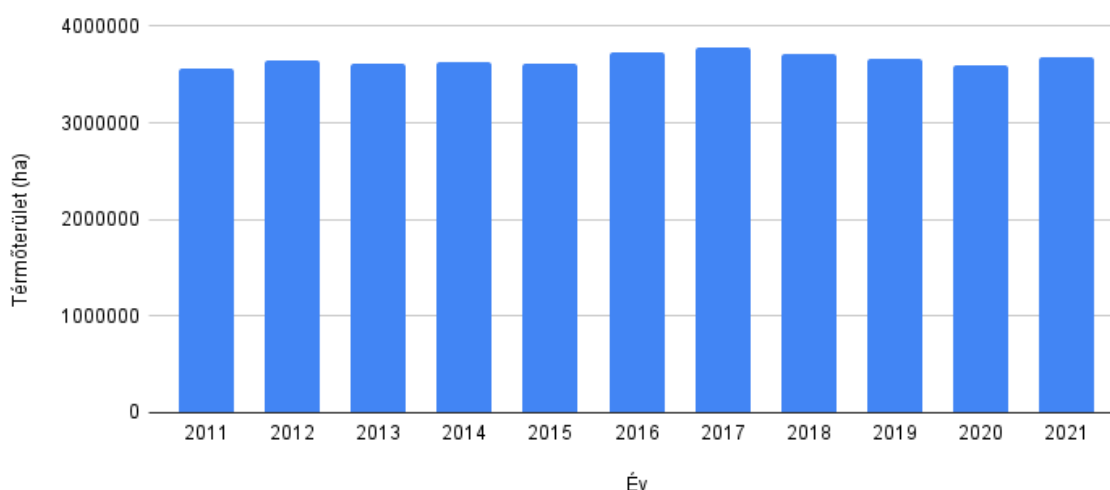
A paprika minden kétséget kizáróan az emberiség egyik legkedveltebb gasztronómiai alapanyaga. Alapvetően kétféle paprikát különböztetünk meg, melyek természetesen rengeteg fajtát takarnak: a kis adagban fogyasztott, általában csípős és vöröses árnyalatú fűszerpaprikák; valamint a nagyobb egyszeri adagban fogyasztott étkezési paprikák (Fári, 1986; Lantos, 2018).

Világszinten talán a chili fajták a legismertebbek és elterjedtebbek, főleg az amerikai kontinens egészén, olyannyira, hogy az Egyesült Államokban a különböző szószok, fermentált és snack chili termékek jelenleg népszerűbbek még a Ketchup-nél is (Crosby, 2008). Európában az étkezési paprika fogyasztása főleg a Balkán országokra jellemző (Csilléry, 2006), a fűszerpaprika pedig Magyarország, Spanyolország, Olaszország és Franciaország konyháinak jellegzetes eleme a só és a bors mellett (Katz, 2009). Hazánkban jelentős a paprika termékek fogyasztása, valamint a fűszer típusok öröme a tradicionális konyha elengedhetetlen része, ez is indokolja a megnövekedett igényt a termelés növelésére.

(Csilléry, 2006). Jelen fejezetben felhasznált KSH és FAO adatok minden esetben a fűszer-és zöldpaprika összesített adatait mutatja.

A világon a legnagyobb területen Ázsiában termesztnek paprikát, 2 577 677 ha 2021-ben a FAO utolsó feljegyzett adata, ez az összes paprika termőterület 70,1%-a. A földrészen belül kiemelkedő az egyébként világelső Kína, második helyen India, harmadik pedig Indonézia, de termőterülettől függetlenül szinte minden ázsiai országban a legnagyobb mennyiségben termelt növények közé tartozik (Berke & Shieh, 2000). A világon élvonalba tartozik több ázsiai ország, ahol mára a tradicionális konyhába integrálódott a paprikák használata (Bosland, 2016), valamint az éghajlatnak és igényeknek megfelelő fajtákat nemesítettek (Berke & Shieh, 2000). 2. ábrán szintén FAO adatok kerültek megjelenítésre, itt láthatjuk, hogy a világon jelentős területen folyik paprika termelés, lényegesen változások nélkül.

A világ paprika termőterületének változása 2011-2021 (FAO)

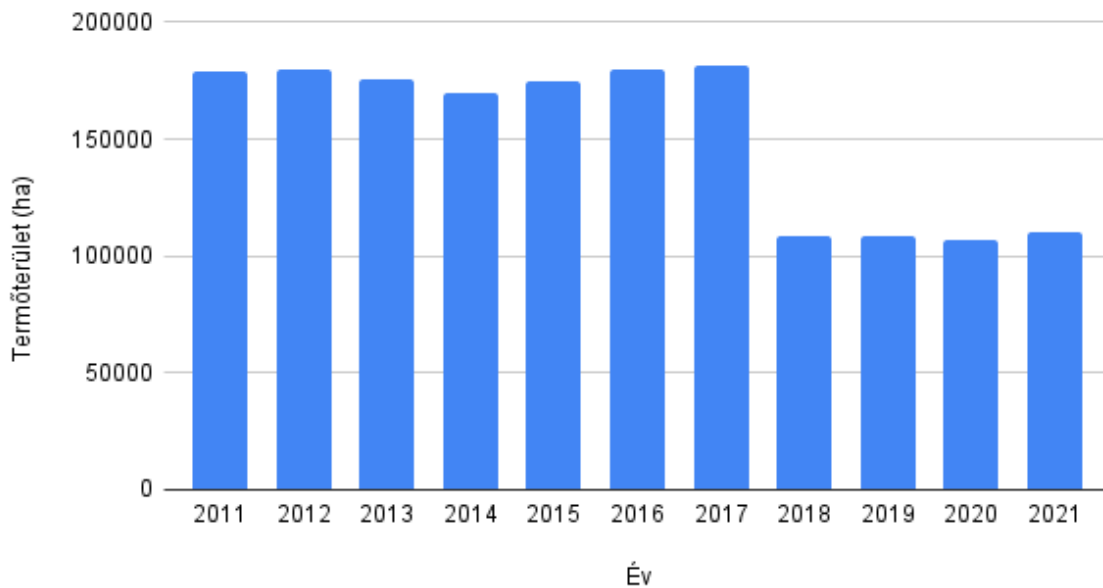


2. ábra: A világ paprika termőterületének változása az elmúlt évekre vetítve

(Forrás: saját szerkesztés FAOStat(2011-2021) adatok alapján)

Európára szűkítve vizsgálódásunkat a FAOStat adatbázisban észrevehetünk egy nagyobb esést a termőterület össz méretében, mint ahogy azt a 3.ábra is mutatja. Ezzel szemben az éves betakarított mennyiség nő, ami annak tudható be, hogy rohamosan terjednek a hajtásos termesztést alkalmazó növényházak, melyek magas belmagasságukkal kevesebb alapterületet igényelnek.

Európa paprika termőterülete 2011-2021(FAO)

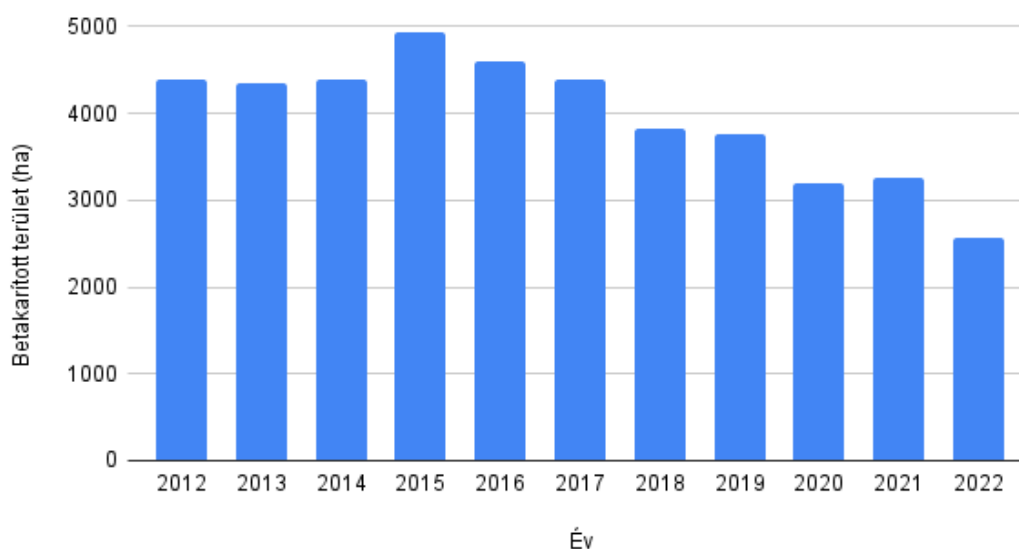


3. ábra: Európa paprika termőterülete 2011-2021 (FAO)

(Forrás: saját szerkesztés FAOStat(2011-2021) adatok alapján)

Magyarországon az utóbbi években rohamosan esik a paprika termelés, ahogy azt a 4. ábrán is láthatjuk. A KSH adatait nagyobb időszorban nézve látszik rendszerváltás idején még 10.000 ha környékén mozgott a termőterület, majd szinte folyamatos mélyrepülésbe kezdett, míg végül a tavalyi évben már csupán 2567 ha volt, 8.2 t/ha termésátlaggal. Az ágazaton belül úgy régóta úgy tartják, hogy megfelelően szervezett termeléssel 20-30 t/ha is elérhető lenne. A csökkenés egyik oka, hogy az Európai Unió csatlakozással megnyílt a piacunk a külföldi termékek számára. A másik ok, hogy a hazai termelők nehezen alkalmazkodnak a klímaváltozás okozta nehézségekhez, nem tudnak felzárkózni technológia szempontjából, beleértve a felhasználható növényvédő szerek listájának szűkülését. Nem elhanyagolható tovább a munkaerő hiány sem (<https://fruitveb.hu/beszamolo-xii-magyar-paprika-napja-hajos-2023-szeptember-8/>)).

Magyarország paprika betakarítási területe 2012-2022 (KSH)



4.ábra: Magyarország paprika termőterülete 2012-2022 között a KSH adatai alapján.

(Forrás: saját szerkesztés KSH(2012-2022) adatok alapján)

2.1.4 Paprika nemesítés Magyarországon

Ahogy korábban említettem, Magyarországon a valódi étkezési paprika termesztés a 19. század végén a bolgárkertészek közreműködésével jelent meg. A technológián kívül a fajtatípusokat is átvettük. Ekkor még a szó szoros értelmében vett nemesítésről nem beszélhetünk, inkább fajtafenntartásról (pozitív szelekció és egyedkijelölés révén). Komolyabb tevékenység Szentesen kezdődött, majd az alföldi tájak, Heves-megyében, Cece és Keszthely környékén alakultak ki először a helyi igényekhez szelektált tájfajták. Az 1940-es évekig nem beszélhetünk szervezett paprika nemesítésről Magyarországon. (Lantos, 2018; Zatykó 2021)

A folyamat előfutárának tekinthető a fehér színű “Cecei típus”, melyet a helyi gazdák a 20-as évekre szelektáltak ki más vonalakból, és ez lett a legelterjedtebb mai magyar paprika fajták alapja. Az első “Cecei” paprikák csípősek voltak, egyedi zamatukkal megváltoztatták az addigi magyar táplálkozási szokásokat és megkezdték máig tartó hódításukat a világpiacra is. Intézményes étkezési paprika nemesítésről nem beszélhetünk anélkül, hogy megemlítenénk Angeli Lambertet, aki 1949-ben a Kertészeti Kutató Intézet (mai ZKI jogelődje) munkatársaként bevonta a “Cecei” populációkat a szelekciós nemesítésbe.

1953-ben áttörésként jelentette be a “Cecei édes 3” fajtát, mely az első édes fehér, nagybogyójú paprika lett és aminek köszönhetően a termésátlagot megkétszereződtek és rohamosan nőtt a paprika fogyasztás. A 60-as évek elején a ma ismert “hegyes erős” (H-2) és “fehér édes” (H-1) hibrid fajták is Angeli munkásságának köszönhetően jöttek létre, valamint halála után munkatársai állították elő a “Fehérözön” fajtát. Ekkor még paprika esetében a nemesítés a termés beltartalmi paramétereinek és alakjának javítását, változtatását szolgálta (Zatykó 2021).

Ezekkel nagyjából egy időben ébredtek rá a nemesítők a CMV okozta nagy paprikapusztulás hatására, hogy a rezisztencianemesítés irányába is kell lépéseket tenni. A 90-es évekre Turi István “Soroksári hajtató” fajtája elkezdte kiszorítani a piacról az addig sikeres paprikákat. Ezek után a paprika nemesítés szerteágazó irányzatokra bomlott, azonban elmondhatjuk, hogy a vírusos fertőzések elleni küzdelem a mai napig kardinális kérdés. Mivel napjaikban a kémiai védelem egyre aggályosabb társadalmi és szakmai megítélés szempontjából, kiemelkedő fontosságú a rezisztencia nemesítés és a keresztezés útján létrejövő rezisztens hibridek kialakítása. Jelenleg a TSWV rezisztencia áttörésére képes törzs leküzdéséhez szükséges nemesítési forrás kutatása prioritást élvez (Tóbiás et al., 2014).

2.1.5 Paprika mutánsok

Mutánsnak nevezzük azt a növényt, mely spontán genetikai változáson (“mutáción”) ment keresztül, és ennek eredményeként bizonyos külső és/vagy belső tulajdonságai nem azonosak a szülőkével, vagy általánosan eltérnek a fajra, fajtára jellemzőtől, és ezt a megváltozott tulajdonságot tovább örökíti az utódaiba (Carlson, 2011). A mutáció lehet természetes eredetű vagy mesterségesen indukált. (Sigurbjörnsson, 1983) Bár alapvetően a mutációk előnytelennek bizonyulnak, bizonyos mutációk agronómiai szempontból előnyös tulajdonságokat eredményeznek. Ezek a beltartalmi értékek, biotikus és abiotikus rezisztencia valamint az ápolást, betakarítást, tárolást segítő tulajdonságok egyaránt fontosak lehetnek nemesítés, termesztés szempontjából.

Természetesen kialakuló véletlenszerű mutáció esetén az egyedet nemesítésbe vonják, többszöri keresztezésnek vetik alá a megfelelő protokoll szerint, hogy a kívánt tulajdonsággal új vonalat hozzanak létre. Mutációt mesterségesen is előidézhetünk, kémiai mutagénnel vagy sugárzással. Ebben az esetben teljesen véletlenszerűek a kialakuló fenotípusok, azonban a kívánatos tulajdonságok általában örökölhetőek lesznek és egy generáció alatt

megváltoztathatjuk a fenotípust (Kumar et al., 2001). Fontos, hogy magas létszámú populációval dolgozzunk, mivel nagy mennyiségben keletkeznek nem kívánatos genotípusok (Crosby, 2008).

Magyarországon paprika mutánsokkal kapcsolatban Csilléry Gábor nemesítő munkássága és gyűjteménye kiemelkedő. A mutánsgyűjtemény több, természetesen kialakult mutánst foglal magába. Fenntartásuk önbeporzással, az ebből származó nemzedék elvetésével, valamint a mutáns fenotípusok szelekciójával zajlik (Csilléry et al., 2023).

2.2 Megnyúlt internódiumú, csavarodó szárú mutánsok

Az általam vizsgált mutáns paprika vonal megnyúlt internódiummal rendelkezik. Ez a fenotípus egy Cecei formájú paprika vonal harmadik utódgenerációjában lett azonosítva., az átlagos 5-8 cm-es helyett 8-11 cm-es szártagokkal rendelkezik. Különleges csavarodó alakját 3-4 leveles korban veszi csak fel, ezért a korai fenofázisokban nehezebb azonosítani a mutáns tulajdonságait (Pápai et al., 2023). Kísérletünk alanya a későbbiekben akár fontos alapja lehet egy hibrid fajtának, hiszen a klímaváltozás, és vele a betegségekkel való küzdelem nehezedése a szántóföldről növényházakba kényszeríti a paprika termesztést, főleg párásabb éghajlaton (Fári, 1986). Az *in vitro* mikroszaporítással előállított paprika egyébként is kiválóan teljesít növényházi körülmények között (Song et al., 2009), különleges növekedésű növényünk pedig tökéletesen alkalmas lehet vertikális termesztésre (Csilléry et al., 2021).

Paradicsom esetében a megnyúlt *internodiumokat* a biológiailag aktív gibberellinek konstans magasabb szintje okozza (Sun et al., 2019). A tulajdonság hátterében a GAox (gibberellin-oxidase) enzimek megfelelő működésének hiánya áll, ezek az enzimek a felelősek a különböző gibberellin vegyületek átalakulásáért biológiailag aktív formából inaktívvá.

Hasonló genetikai háttérrel írtak le mutánsokat rozsban (Lanahan et al., 1988) és borsóban (Martin et al., 1999) is.

A gibberellinek szerepe régóta ismert a növényi növekedés és fejlődés során, folyamatos jelenléte hosszabb szárat, világosabb levelet és gyengébb fertilitást eredményez (Davière & Achard, 2013). Ennek ellenére egy hosszabb, rugalmasabb szerkezetű a szár lehetőséget nyithat egy alternatív, esetleg vertikális termesztésre annak függvényében, hogy mennyi termést is képes elbírn.

2.3 *In vitro* mikroszaporítás

2.3.1 Története

A szó szerinti mikroszaporítás története alig 100 évre nyúlik vissza, mielőtt azonban megtekintjük ezeket a mérföldköveket, vessünk egy pillantást néhány triviálisnak tűnő előzményre, amik nélkül nem jöhetett volna létre a módszer. 1590-ben Zacharias Jansen holland szemüveg készítő megalkotta az első mikroszkópot, az eszköz rengeteg finomítás és fejlődés után lehetővé tette 1665-ben, hogy Robert Hooke megpillantsa és elnevezze az élő szervezeteket alkotó sejteket. Az 1800-as években megszületett a totipotencia gondolata és a sejtelmélet (Schwann, 1839), majd felfedezték a sejtosztódást (Virchow, 1858). Ezzel párhuzamosan a mikroszaporításhoz elengedhetetlen sterilitás fogalma is elkezdett körvonalazódni, 1864-ban Pasteur megalkotta a róla elnevezett fertőtlenítési eljárást, a század második felében pedig már sejtették, hogy a fertőzéseket élő mikroorganizmusok okozzák, valamint megjelentek az első teljes sterilizálási technika (Koch, 1882). Sérült fákon már a 18. században megfigyelték a kallusz kialakulását, a 20. század elejétől pedig megtermékenyítési kísérletek folytak, az első vegetatív szervvel történő *in vitro* szaporítás 1949-ben valósult meg, majd 1959-ben az első sikeres szomatikus embriogenezis kísérletek is lezajlottak. (<https://courses.cit.cornell.edu/hort494/universe/history/history.html>)

2.3.2 Alapjai

Az *in vitro* mikroszaporítás kifejezés olyan eljárásokat takar, melyek segítségével a növényt vegetatív vagy generatív szerveiből, szövetekből, sejtekből kiindulva tenyésztjük. Célja a lehető legnagyobb mennyiségű regenerátum előállítása (Butt et al., 2015). A steril mikroszaporítás mára széles körben elterjedt módszer, nem csak a kutatás területén, de üzemi technológiák részeként is használják. A sterilitás azért fontos, mert a használt inokulumok apró méretükből adódóan nagyon érzékenyek a patogénekre, így csak steril körülmények között maradnak életben és nevelhetjük őket, valamint így maradhat kórokozó mentes az állomány és a róluk szaporított utódok hosszú távon (Cassells, 1997).

Munkám során az *in vitro* mikroszaporítási eljárását alkalmaztam, mely a növényi sejtek totipotenciáját használja ki (Steward et al., 1970), ezen belül is járulékos

hajtástenyésztést végeztem. Ez a módszer tulajdonképpen klónozásként is felfogható, mivel az új egyedek szomatikus sejtekből alakulnak ki, genetikailag azonosak egymással és a kiindulási növényvel. Megfelelő feltételek mellett bizonyos részek a növény teljes regenerációjára képesek, ezt használjuk ki az eljárás során. A módszer járulékos volta azt jelenti nem az eredeti inokulumok adják majd az utódnövényeket, hanem a belőlük fejlődő kalluszból végezzük a regenerációt (organogenezis) (Khan et al., 2011).

Az *in vitro* mikroszaporításnak két hatalmas előnye van, amely vitathatatlan oka annak, hogy kutatás és termesztés terén egyaránt előszeretettel alkalmazzák. A módszerrel lehetővé vált a tömeges előállítása olyan növényeknek, melyek egyrészt genetikailag azonosak (klónok) tehát az egyes egyedek nagy valószínűséggel nem fognak meglepetésszerűen rosszabb tulajdonságokat mutatni. Másrészt a steril körülmények miatt a növények biztosan mentesek mindennemű patogéntől, vírusmentes szaporítóanyag előállítása a termesztésben nélkülözhetetlen (Wang & Charles, 1991).

2.3.3 Alkalmazás jelentősége paprika esetében

Paprika fajták esetében viszonylag magas keresztbeporzási arányokról beszélhetünk szántóföldi körülmények között, átlagosan akár 91%-os is lehet (Tanksley, 1984), ez pedig a fajtatípustól eltérő egyedeket, valamint nem kívánatos mértékű genetikai variabilitást, gyors állományminőség romlást okozhat. Szóba jöhet még a manuális beporzás, mint hatékony technika, ez azonban jóval drágább, ezért kevésbé kívánatos. Fontos tényező még, hogy természetes körülmények között a paprika nem képes vegetatív szaporodásra (Christopher & Rajam, 1994), ezért ha hatékonyan szeretnénk paprika növényeket előállítani nagy mennyiségben, érdemes az *in vitro* mikroszaporításhoz folyamodni.

A paprika organogenezissel történő, azaz vegetatív mikroszaporítása több okból is kulcsfontosságú. Léteznek olyan kiemelkedően előnyös tulajdonsággal rendelkező vonalak, melyekre jellemző a hímsterilitás, amit időigényes és bonyolult visszakeresztezésekkel ugyan ki lehet küszöbölni, azonban a vegetatív mikroszaporítás egy sokkal egyszerűbb megoldás a problémára (Gupta et al., 1998). Szintén ennek a módszernek köszönhető a hatékony transzgénikus növény előállítása (Steinitz et al., 1999), valamint a dihaploid növények generálása mikrospórából és pollenből (Regner, 1996).

Kísérletünk szempontjából azért ideális választás ez a módszer, mert egyrészt nagy mennyiségű utódnövényt kapunk rövid idő alatt (Ma et al., 1991), tehát bőven lesz kísérleti alanyunk. Másrészt a növényeink genetikailag azonosak, ezzel kiküszöbölhetők az eredményt meghamisító egyedi eltérések az állományban. A paprika különösen jó alany az *in vitro* mikroszaporításhoz, mivel más növényekkel szemben a táptalajon hamar gyökeret növeszt és kifejlődnek az utódnövények (Gunnay & Rao 1978).

Munkám során *cotyledon* és *hypocotyl* explantumokat használtam, erről bővebben a 3.6 fejezetben írok, itt azonban szeretnék pár szót ejteni más lehetőségekről is. Paprika esetében sikeresen alkalmazhatjuk az *in vitro* mikroszaporítást kimetszett embriókon is (Fári, 1986), amennyiben a cél hibridizáció, bizonyos tulajdonságok átvitele fajták között (Debbarama et al., 2013; Rogo et al., 2023). Amennyiben tömegesen szeretnénk haploid paprika növényeket előállítani, portok kultúrával kell dolgoznunk (Mitykó & Gémes 2006). Ezek a növények tökéletesen alkalmasak növénytermesztők számára kiindulásnak, mivel már az első generációban tiszta vonalat hoznak, rengeteg időt és költséget spórolva (Sanchez et al., 2020). Lehetséges sikeres protoplaszt izolálás és abból regenerálás (Saxena et al., 1981), valamint kalluszból, sejtszuspenziós kultúrából történő teljes növény regenerálás (Zatykó et al., 1982)

2.4 Növényi hormon mechanizmusok

In vitro kultúrák esetében elengedhetetlen, hogy megemlítsük a fitohormonokat, illetve az általuk mutatott növényi válaszreakciókat.

2.4.1. Auxinok

Az auxinok a legrégebb óta ismert fitohormonok, ennek ellenére még feltáratlan működésük és szerepük teljes természete. Nevük beszédes: a görög *auxein* azaz növelni kifejezésből ered, mivel rengeteg különböző növekedési és fejlődési folyamatban vesznek részt. Ipari termelésben gyakran használják gyökereztetésre (Frankenberger & Arshad 2020). Az auxinok továbbá a foto-és gravitropizmus meghatározó fitohormonjai (Muday 2001). Jelenlegi tudásunk szerint az indol-3-ecetsav (IAA) a fiziológiás folyamatokban legaktívabban résztvevő auxin.

Auxinokat megkötni képes fehérjék, illetve auxin receptorok létezése régóta ismert (van der Linde et al., 1984), azonban a folyamatos kutatások ellenére sem ismerjük számos paraméterüket. Az auxin hatásmechanizmusának teljes felderítése szintén zajlik még, azonban létezik két elmélet rá. Megfigyelték, hogy bizonyos auxin koncentrációk mellett emelkedett a növényben az mRNS szint, továbbá az is kiderült, hogy ez a jelenség transzkripcióban történő változásokhoz köthető (Theologis et al., 1985). Egy másik megfigyelt jelenség, hogy auxinos kezelésre történő gyors sejt megnyúlás emelkedett proton (avagy Hidrogén anion) kiválasztással jár, mely savasítja a szövetet. Proton kiválás több módon is történhet, azonban ebben az esetben a H-ATPáz tűnik a mechanizmus alapjának, az inhibitorok hasonlósága miatt (Cleland & Rayle 1978).

2.4.2. Citokininek

A citokininek alapvetően sejtosztódást előidéző fitohormonok, erre utal gyűjtőnevük is, mely a citokinézis, a sejt fizikai kettéválását jelentő szóból ered. Ez a hatás igen sokszínűen jelentkezik a növényekben: kloroplaszt fejlődés, rügy differenciálás, hajtás inicializálás, növekedés, levél öregedés (Brault & Maldiney, 1999).

A citokininek génexpresszió útján fejtik ki hatásukat. A növényi sejt plazma membránjában található specifikus receptorhoz kötődve, melynek sejtek belüli része egy foszfát csoportot kapcsol egy, a citoszolban található fehérjéhez. Ez a fehérje a sejtmagba vándorolva aktiválja a megfelelő transzkripciós faktorokat, ami végül a citoszolba visszakerülő mRNS-eket eredményez. Ezeket lefordítva készülnek el azok a fehérjék, melyek segítségével végül a növény végre tudja hajtani a citokinin által adott utasításokat (Schmülling et al., 1997).

Kísérletünk során 6-benzil-amino-purin (BAP) szintetikus citokinint használtuk, mint növekedés serkentőt, különböző dózisokban, hogy kidolgozhassuk a *tti* mikroszaporítási protokollját.

2.4.3. Gibberellinek

A gibberellinek nevüket a *Gibberella fujikuroi* gombáról kapták, mert először ennek a patogénnek a szekrétaumaként azonosították őket. Az általa okozott betegség egyik tünete a túlzott növekedés. Későbbi kutatások állapították meg, hogy ez az anyag természetszerűleg a

növényekben is jelen van, sőt a növekedést, az érést és a termékenyülést is szabályozza (Hedden & Sponsel 2015).

A felsorolt hatásokat a gibberellin úgy fejtí ki, hogy egyszerűen gátolja a gátló tényezőt (Harberd et al., 1998). Ennek egyik leggyakoribb következménye fiatal hajtások esetén, hogy a növény az átlagosnál jobban megnyúlik azonban a nóduszok száma nem változik, tehát valójában az internódiumok nyúlnak meg. Ez úgy lehetséges, hogy maguk a sejtfalak nyúlnak meg, a várakozásokkal szemben nem turgornövekedés, hanem ernyedés miatt (Cosgrove & Sovonick-Dunford 1989).

A sejtben jutva a gibberellin a GID1 oldható receptor fehérjéhez kötődik, ami így képes az SCF komplexhez kötődni, ami segíti az ubiquitin DELLA fehérjékhez való kapcsolódását. Ezek a műveletek a gibberellinhez tartozó transzkripciós faktorokat lekötve tartó DELLA protein pusztulásához vezet, így kifejeződhetnek az addig elnyomott gének (Murase et al., 2008).

3. Anyag és módszer

3.1 A Tortuous internode mutáns paprika

Kísérletem tárgya, a *Tortuous internode*, ahogy elnevezéséből is sejthető, egy olyan mutáns paprika fajta, melynek szártagjai a szokásosnál hosszabbra nyúlnak, szára enyhén csavarodik, valamint elfekszik a talajon. A mutáns nemesítési vonalak önbeporzással vannak fenntartva (Shu et al.,2012), a kísérlethez felhasznált magok is önterményekítésből származnak. melyeket Csilléry Gábor (PepGen Kft.) biztosította. Kontrollként egy normális szárnövekedést mutató paprikára, az ismert magyar fajtára, a 'Fehérözön'-re esett a választásunk (Royal Sluis Magrovet Kft., Kecskemét, Hungary).

3.2 Murashige-Skoog táptalaj

A kísérletek során MS táptalajt alkalmaztunk minden esetben, a kontroll csoport hormonmentesen, míg a kísérlet többi alanya hormonokkal kiegészített változatán. A táptalaj összetevőit és arányaikat az 1.táblázat mutatja, a kiválasztott végmennyiséghez igazítva szükséges mérni az összetevőket.

Először a makro-, mezo-és mikroelemekből, valamint a vitaminokból (kivéve inozitol) készült törzsoldatokból mértük össze az összetevőket egy lombikba, utána hozzámértem a szükséges szacharózt és a myo-inozitolt, mint száraz hozzávalót. Az így készült oldatot áttöltöttem egy mérőhengerbe és a kívánatos térfogat eléréséig hígítottam desztillált vízzel, majd az egészet visszatöltöttem a lombikba. Automata pH-mérő segítségével 5,6-5,8 tartományon belülre állítottam be a táptalajunk pH-ját, ezután pedig az utolsó hozzávaló, az agar por is bemérésre került. A táptalajt alumínium fóliával lezárt lombikokban 20 percre autoklávba helyeztem, hozzávetőlegesen 121 C-on és 15 psi-n sterilizáltuk. A sterilizált táptalajunkat előzetesen hőlégsterilizált petricsészékbe töltöttem, megszilárdulás után szorosan lezártam, mindvégig lamináris boxban dolgozva (Murashige &Skoog, 1962).

Mint korábban említettem, a tiszta MS táptalajon a kontroll csoport nőtt, a növényállomány nagyobb része pedig 1-4 mg/l BAP hormonnal kiegészített táptalajokon.

1. táblázat: MS táptalaj összetevői*(Forrás: Murashige & Skoog, 1962 nyomán)*

Összetevő típusa, megnevezése		Bemérendő mennyiség
Makroelemek	KNO ₃	1900 mg/l
	NH ₄ NO ₃	1650 mg/l
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	440 mg/l
	MgSO ₄	370 mg/l
	KH ₂ PO ₄	170 mg/l
Mezoelemek	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8 mg/l
	Na - EDTA	37,7 mg/l
Mikroelemek	MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3 mg/l
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6 mg/l
	H ₃ BO ₃	6,2 mg/l
	KJ	0,83 mg/l
	Ma ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25 mg/l
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025 mg/l
	CoCL ₂ x 6 H ₂ O	0,025 mg/l
Vitaminok	inozitol, B8	100 mg/l
	tiamin, B1	0,1 mg/l
	nikotinsav, B3	0,5 mg/l
	piridoxin, B6	0,1 mg/l

	glicin	2 mg/l
Egyéb	agar	8 g/l
	szacharóz	30 g/l

3.4 Körülmények

3.4.1 Sterilitás

A kísérlet elvégzéséhez a kiültetés kivételével minden lépést lamináris boxban végzünk, ez biztosítja, hogy a környezetünk steril legyen. Előre sterilizált tárolókkal és eszközökkel dolgozunk, melyek menet közben is fertőtlenítésre kerülnek szükség esetén vegyszeres úton és hevítéssel. A felhasznált táptalajok eleve sterilek. A táptalajon lévő növényeket tartalmazó tárolókat minden esetben gondosan lezárjuk fertőtlenített alufóliával, filmmel így helyezzük a fitotronba vagy a növényszobába.

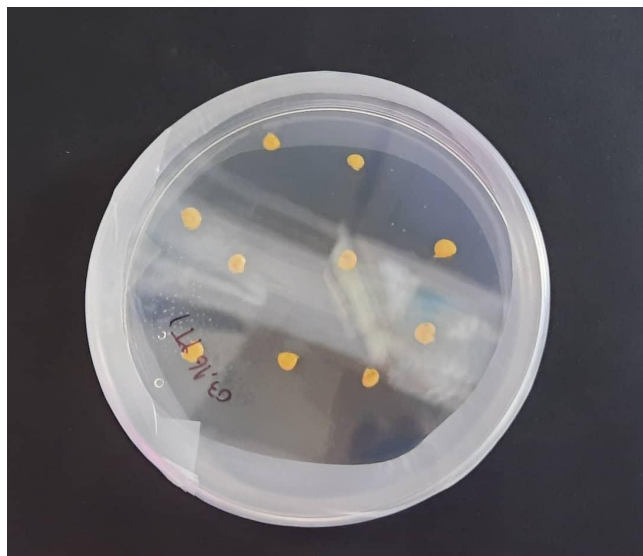
3.4.2 Fitotron és növényszoba

Növényeink nevelése fitotronban történt, ahol 2-3 hétig háborítatlanul fejlődhettek két munkafolyamat között. Kísérletünk esetében a növények először fitotron kamrába kerültek, itt történt a magok csíráztatása, az első explantumokból való nevelés. Később a megmaradt és több hajtást elérő növények átkerültek a növényszobába, ahol kevésbé erősen kontrolláltak a körülmények.

A fitotronban állítható a hőmérséklet, valamint a megvilágítás időtartama és erőssége. A kísérlethez használt paprika igényeihez alkalmazkodva a következő beállításokat használtuk: 16 óra megvilágítás 3000 LUX fényerősséggel, 8 óra sötétség, hőmérséklet 25°C +- 1°C. Mindezek a körülmények alapvetően a paprika növény természetes élőhelyének éghajlatát és a nappal-éjszakai megvilágítás változását hivatottak szimulálni.

3.5 *In vitro* csíráztatás

A munkafolyamat első lépése maga is sterilizálás, a felhasználandó magokat szükséges így előkészíteni a táptalajra helyezés előtt. Felületi fertőtlenítéssel kezdünk, steril lombikban 45 másodpercen keresztül folyamatosan rázatjuk a magokat 70%-os etanol oldatban, majd 20 percig 1%-os hypoban áztatjuk őket, folyamatos gépi rázás mellett (Fári, 1986; Hussain et al., 2021). Ezután a hypo teljes eltávolításához háromszor leöblítjük a magokat steril desztillált vízzel, és kihelyezzük őket az előzőleg elkészített és steril petricsészébe öntött táptalajon. A magok elhelyezése fertőtlenített, steril csipesszel történik, Egy-egy csészébe annyi mag kerül, egymástól egyenlő távolságra, hogy minden esetleg kifejlődő növénynek jusson elegendő hely a gyökerezésre, ahogy az 5.ábrán is látható. A magokat hormonments MS táptalajra helyeztem, mivel itt fontos volt, hogy azonos fejlettségi állapotban lévő növényeket kapjak, a hormonok bevonása a későbbiekben történt.



5.ábra: Táptalajra helyezett magok

(Forrás: saját fénykép)

A magokat tartalmazó sterilen lezárt Petri-csészéket a megfelelő beállításokkal rendelkező fitotronban helyeztem el.

3.6 A növényi explantumok előkészítése, azok táptalajra helyezése

A növényekről az ideális első szikleveles formában steril szikével leválasztottam azokat a részeket, melyek paprika esetében a legmagasabb regenerációs potenciállal bírnak (Gunnay & Rao, 1978; Fári, 1986): a *cotyledont* és a *hypocotylt*, majd kisebb darabokra vágtam őket. Ezeket a magokhoz hasonlóan steril csipesszel táptalajra helyeztem (6. ábra, 7. ábra), végig lamináris boxban dolgozva. A vegetatív szaporítás alapját, mint korábban említettük a növényi regeneráció képessége adja. Az eltávolított szerveket úgy választottam le, hogy nagy eséllyel tartalmazzon merisztéma szövetet (Gunnay & Rao, 1978) a vágásvonal, ennek mentén számíthatunk rá, hogy a konikulumok kalluszt és gyökeret, hajtást fejlesztenek, majd sziklevelet, és végül egy teljes növényt regenerálnak.



6. ábra: Cotyledonok a táptalajon

(Forrás: saját fénykép)



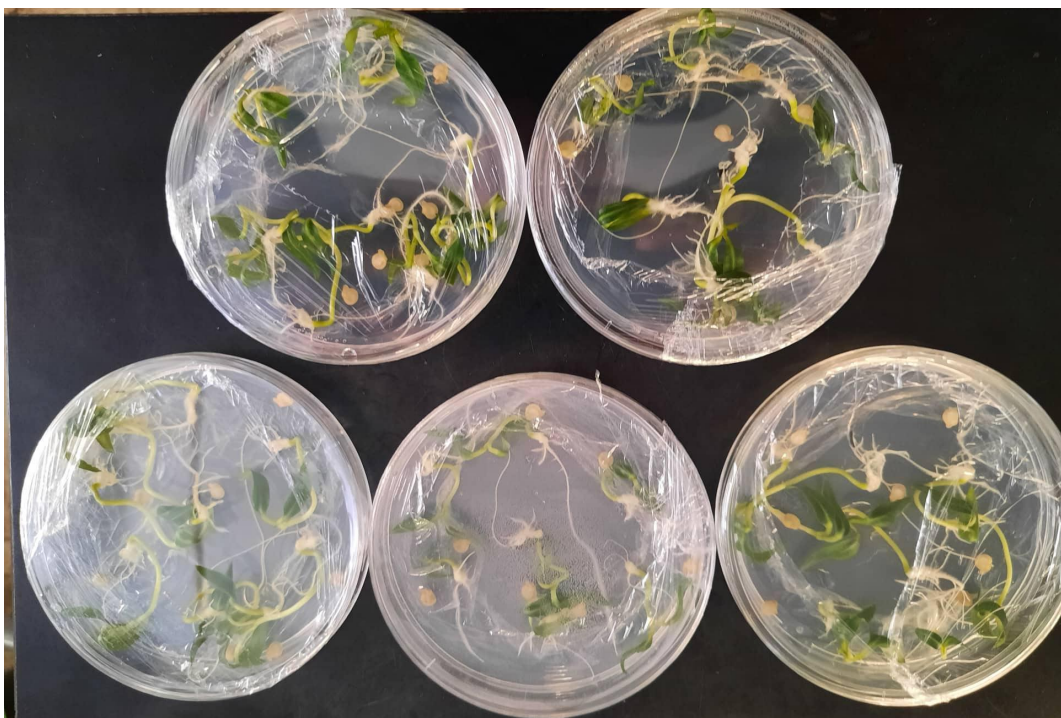
7.ábra: Leválasztott hypocotyllok a táptalajon
(Forrás: saját fénykép)

Az explantumokat már különböző mennyiségű BAP hormon tartalmú táptalajokra helyeztem, mindegyikre 10 darabot. Összehasonlításként a *tti* és a 'Fehérözön' explantumait hormonmentes táptalajra helyeztük, hogy megfigyeljük a különbségeket a normál-, illetve abnormális szárnövekedésű típusok explantumai által mutatott válaszreakciók között. A *tti* növények mikroszaporítási kísérleteként a mutánsok explantumait hormonmentes, illetve 1-4 mg/l BAP koncentrációjú táptalajokra helyeztük. Az explantumokat fitotronban neveltük tovább.

4.Eredmények és értékelésük

4.1 *In vitro* csíráztatás

Az *in vitro* magsterilizálási, illetve csíráztatási protokollt követve 100%-os csírázást értünk el, az eredmény egy részét a 8.ábra szemlélteti. Rendszeres ellenőrzés mellett 3 hét elteltével érték el azt a fejlettségi állapotot, ami szükséges volt, hogy elvégezzem az explantumok előkészítését (Fári & Czakó 1980). A magok már korábban gyökeret eresztettek, számomra azonban érdekesebb volt, hogy a növények szárat és sziklevelet fejlesztettek, ezekkel tudtam tovább dolgozni. Ahogy a 9.ábrán is látszik, ilyen fiatal korban még nem figyelhető meg a mutáns fenotípus (Pápai et al., 2023). Az így előállított növényekből készültek az explantumok, ez bővebben 3.6 fejezetben került kifejtésre.



8.ábra: Az állomány egy része, amely sikeresen elérte az első szikleveles formát
(Forrás: saját fénykép)



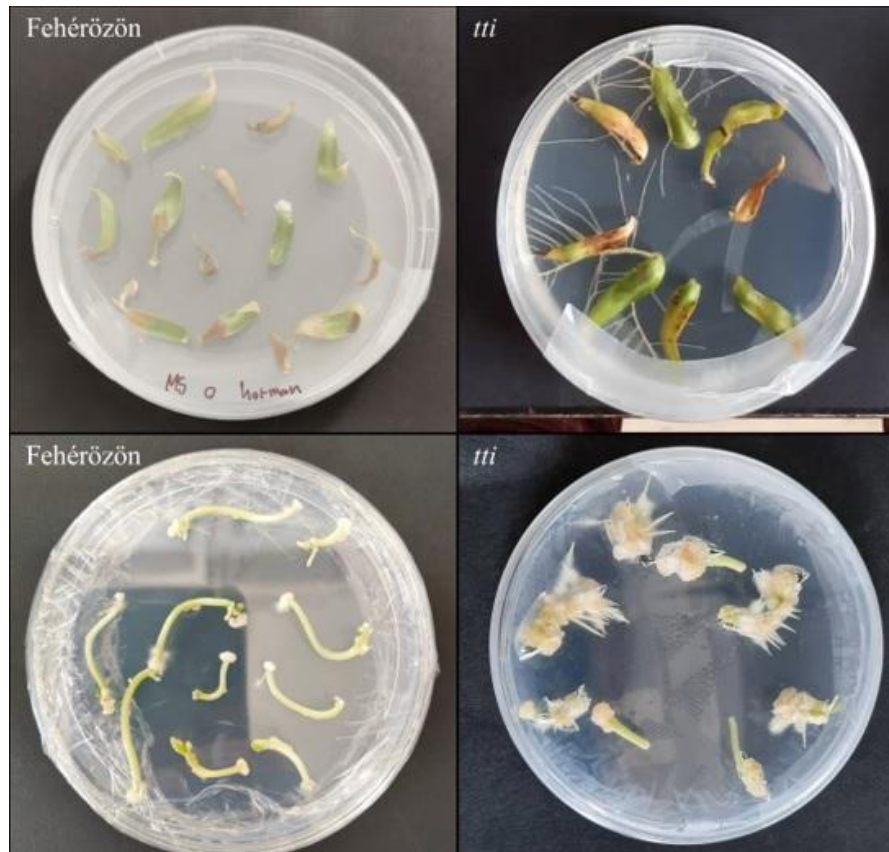
9. ábra: Első szikleveles fejlettségű növények közelről a petricsészében
(Forrás: saját fénykép)

4.2 *titi* és kontroll növények explantumainak összehasonlítása MS táptalajon

A 10. ábrán látható, hogy a 3.6 fejezetben említett explantumok hormonmentes MS táptalajra helyezett csoportjai milyen állapotban voltak 2 hét elteltével. Megfigyelhetjük, hogy az explantumok szép, egészséges állapotban vannak, azonban rögtön szembetűnik, hogy míg a kontroll csoport nem változott meg számottevően, addig mutánsaink máris eltérő reakciót mutattak. A *titi* esetében a *hypocotyl* és a *cotyledon* explantumok is kiemelkedően magas gyökeresedést mutattak a hormonkezelés nélküli MS táptalajon. A folyamatot fitohormonok befolyásolják (lsd. 2.3 fejezet), nevezetesen az auxin, melyet gyakran használnak is gyökérképződés indukálására *in vitro* körülmények között. Ebből levonhatjuk a

következtetést, hogy a *titi* mutáns paprika a normálhoz képest túlermelést mutat ebből fitohormonból, hiszen a táptalaj nem tartalmazott hormont, mégis beindult a gyökérképződés.

2.2 fejezetben láthattuk, hogy a megnyúlt internódium, mely tulajdonságot idővel a *titi* is mutatja majd, általában gibberellin túlermeléshez, a biológiailag aktív gibberellinek konstans jelenlétéhez köthető. A kísérlet eredményei alapján valószínű, hogy a *titi* esetében a mutáns fenotípus megjelenése extrém mértékű auxin és gibberellin bioszintézisre vezethető vissza.



10.ábra: hormonmentes MS tápalajon fejlődő Fehérözön és *titi* explantumok (2 hetes állomány)

(Forrás: saját fénykép)

4.3 A BAP hormon kezelés eredményei

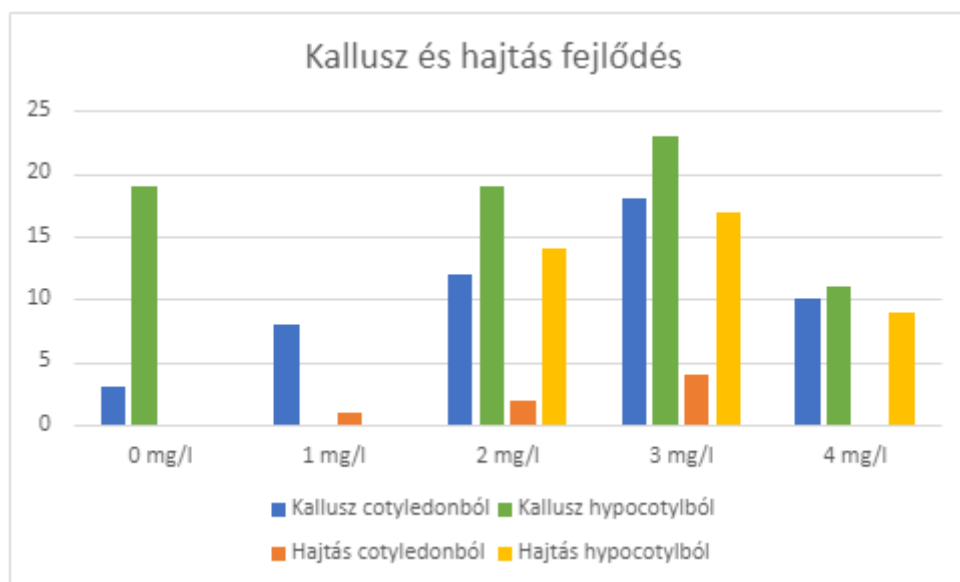
Hogy kidolgozzunk egy optimalizált mikroszaporítási protokollt a mutáns növényeink számára, tekintsük meg a BAP kezelt táptalajokra helyezett *titi* explantumokat. A különböző

explantumokból kialakuló hajtások, kalluszosok arányát a hormonkoncentrációkkal összevetve a 2.táblázat tartalmazza

2. táblázat: BAP tartalmú és hormonmentes MS táptalajon fejlődött *kallusz* és hajtásmennyisége a különböző explantumok esetén (Forrás: saját munka)

	Kallusz (db)					Hajtás (db)				
BAP mg/l	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Cotyledon	3	8	12	18	10	0	1	2	4	0
Hypocotyl	19	0	19	23	11	0	0	14	17	9

A táblázatban láthatjuk, hogy kallusz fejlődés szempontjából a 3 mg/l BAP koncentráció bizonyult optimálisnak, az explantumok 33,3%-a fejlesztett kalluszt ezen a koncentráció szinten. Bár az eredményekben vannak szórások, a kísérlet alapján úgy tűnik kalluszosodás szempontjából nem mérvadó milyen explantumot használunk. Azonban, ha hajtásokat szeretnénk elérni, látható, hogy kifejezetten a hypocotyl produkálja a legjobb hajtást, szintén 3 mg/l BAP koncentráción (44,7%). A kapott eredményeket a 11.ábra szemlélteti.



11.ábra: Kallusz és hajtás fejlődés különböző explantumokból az egyes hormonkoncentrációk mellett.

(Forrás: saját mérési adatokból szerkesztett diagramm)



12.ábra: Kallusz és hajtás megjelenése hormonnal kezelt explantátumokon

(Forrás: saját fénykép)

A 12.ábrán láthatjuk a különböző explantumokon fejlődött kalluszokat és hajtásokat.

4.4 *tti* regenerátumok mikroszaporításának további lépései

4.2 fejezetben említésre került, hogy a *tti* explantumok hormonmentes táptalajon is nagy mértékű gyökeresedést mutattak, ezért a regenerátumok továbbszaporításához már csak MS táptalajt használtunk. A sterilen leválasztott kalluszok és hajtások a korábbinál nagyobb tenyésztő edénybe kerültek, kisebb egyedszámban (13.ábra). Ezt az állományt már növényosztóban neveltem.

A kalluszokból végül nem sikerült növényt regenerálni, sőt el is pusztultak idővel, így megfontolandó egy külön protokoll kidolgozása.

Hajtásaink ellenben szépen fejlődtek, gyökeret eresztettek mindenféle extra hormonos kiegészítés nélkül és elkezdtek növényt regenerálni (14.ábra), így 2-3 hét múlva átraktam őket befőttes üvegekbe.



13.ábra: Leválasztott kalluszok és hajtások befőttesüvegben
(Forrás: saját fénykép)



14.ábra: Regenerált növények az üvegben
(Forrás: saját fénykép)

4.5 Akklimatizációs fázis

Mikor a regenerált növények elérték átlagosan a 4-6 hetes kort, tehát 3-4 levéllel rendelkeztek, készen álltak rá, hogy az eddig biztonságot nyújtó steril üveg, kiegyensúlyozott táptalaj, valamint a szabályozott növényesobai körülmények elhagyásával is életben maradjanak. A növényeket csipesszel óvatosan eltávolítottam az üvegekből és egyszerű virágföldbe ültettem, majd befőttesüveggel letakartam azokat, hogy biztosítsam számukra a magas páratartalmat, hasonlóan ahhoz a szinthez, amit *in vitro* kultúrában megszoktak. Immár nem sterilen, hogy fokozatosan szokjanak hozzá a szabályozatlan körülményekhez.

2 hét elteltével az üveg is lekerült róluk, mikor már képesek alkalmazkodni új környezetükhöz. 15. ábrán láthatjuk az egyik növényt az akklimatizációs fázis végén, ekkor még normális fejlődést mutatott, mivel még nem érte el azt a fejlettségi szintet, amikor a mutáns fenotípus láthatóvá válik. A második ábrán ugyanez a növény 1 hét múlva, már elég fejlett ahhoz, hogy megfigyelhetővé váljanak a megnyúlt *internodiumok* és felvegye a kúszó formát.

Korábbi kísérletek igazolják, hogy a *tti* mutáns láthatóan érzékeli a fényt és a gravitációt is, reagál is ezekre az ingerekre, a tropizmust azonban legyőzi egy másik hatás. 2.3 fejezetben említettem, hogy a gibberellin a növény szárát nem sejtosztódás serkentésével, hanem inkább a sejtek megnyúlásával okozza, ami nem turgor növekedés, hanem sejtfal gyengülés miatt lehetséges. Feltételezhetően a *tti* azért nem képes vertikálisan állni, mert nagy mennyiségű gibberellin hatása alatt áll folyamatosan, ennek köszönhetően a gyengült falú sejtek nem képesek a megnyúlt szárát szabályosan tartani.



15.ábra: Akklimatizált *tti* növény;a mutáns fenotípus idővel egyre jobban megfigyelhető
(Forrás:saját fénykép)

5. Következtetések és javaslatok

Kísérletem célja a *tti* mutáns paprika vonal elfekvő szárát kialakító és befolyásoló tényezők közelebbi megismerése volt. Az alábbiakban összefoglalom munkám során milyen következtetésekre jutottam a rendelkezésre álló szakirodalom segítségével, illetve milyen további lehetőségeket látok a *tti*-val való munkában.

Az elvégzett *in vitro* mikroszaporítás sikeresnek bizonyult a felhasznált táptalajon a *hypocotyl* és *cotyledon* explantumok esetén. A BAP dúsított táptalajokkal végzett összehasonlításból kiderült az is, hogy 3 mg/l BAP kezelés mellett fejlesztik a legtöbb továbbszaporítható hajtást ezek az explantumok. Kalluszból történő növény regenerálás azonban nem sikerült a kísérlet során. Ezt a vonalat érdemes lehet tovább folytatni más táptalajjal és/vagy fitohormon kezeléssel, hogy lehetővé tegyünk a *tti* transzformáció kísérleteket is a jövőben tervezett génexpressziós vizsgálatokhoz.

Csíráztatáskor és az explantumokkal való munka során is tapasztaltam extrém mértékű gyökeresedést a *tti*-nél. Ennek hátterében úgy gondolom egy folyamatos abnormális auxin szint állhat. Ezt okozhatja olyan genetikai tényező, ami miatt eleve magasabb intenzitással folyik az auxin bioszintézis, vagy más hatás, ami miatt a növény nem képes regulálni az auxin szintet. Az eredmények alapján nemcsak a giberellin, hanem az auxin hormonháztartás is felborult a mutáns vonalunkban. Az extrém mértékű gyökeresedés mikroszaporítás szempontjából mindenképpen hasznos tulajdonság.

A nagy mennyiségű giberellin folyamatos behatására utal az, hogy a *tti* nem képes vertikálisan álló szárát fejleszteni. A giberellin ugyanis a sejtfalak gyengítésével, a nóduszok számának növelése nélkül képes megnyújtani a növények szárát. Az ernyedett falú sejtek nem képesek az abnormális hosszúságú szárát függőlegesen tartani, így az egész növény "eldől".

Ránézésre ez a forma kompatibilis lehet modern növényházi vertikális termesztési módokkal, azonban úgy vélem mindenképpen szükség lenne további kísérletekre, hogy kiderítsük érdemes-e termesztésbe vonni. A gyengült sejtfalak miatt szükséges próbára tenni a *tti* terhelhetőségét, hogy kiderüljön egyáltalán elbír-e olyan mennyiségű termést, ami mellett megéri egy esetleges hibridet szaporítani belőle.

Összességében úgy gondolom munkám során sikerült az *in vitro* mikroszaporítási rendszert kidolgozni a mutáns paprika vonalunkra, így megfelelő mennyiségű azonos

genotípusú egyedek tudunk előállítani, melyeket felhasználhatunk a jövőben tervezett vizsgálatokra melynek célja a *ttr* mutánsok megismerése.

6. Összefoglalás

A paprika napjainkban a világ egyik legnagyobb mennyiségben termelt és fogyasztott növénye, melynek története több ezer évre nyúlik vissza.

Magyarországon hagyományosnak is nevezhető termesztése és fogyasztása, azonban a kímaváltozással és a növekvő igényekkel jelenleg a gazdálkodók nem tudják tartani a lépést, ezért fontos az alternatív technológiák és azokhoz alkalmas fajták nemesítése felé fordulni. Ehhez gyakran használnak spontán kialakuló mutánsokat, melyek agronómiailag kívánatos fenotípust hoznak.

Ahhoz, hogy ezeket a mutánsokat integrálni tudják egy-egy új vonalba, szükséges felderíteni az örökítendő tulajdonság természetét. Ehhez kiváló módszer az *in vitro* körülmények alkalmazása. Az *in vitro* mikroszaporítással rövid idő alatt magas egyedszámú, homogén genetikai állományú kultúrát kapunk. Az *in vitro* körülmények kontrollált körülményeket biztosítanak a kísérletek elvégzéséhez. A paprika régóta népszerű alanya a különböző *in vitro* alapú kutatásoknak, így módszertől függően kidolgozott alap protokollok állnak rendelkezésre a táptalaj elkészítésétől az akklimatizációig.

A növények fejlődését és életfolyamatait fitohormonok irányítják, sokszor a spontán létrejövő mutáns egyedek is annak köszönhetik különleges tulajdonságukat, hogy egy adott hormon termelődését vagy érvényesülését befolyásolja a genotípus. A *tti*-hez hasonló tulajdonsággal rendelkező mutánsokat azonosítottak más növények között is, ezekben a megnyúlt internodiumú, csavarodó szárú vonalakban úgy gondoljuk nagy potenciál lehet alternatív termesztési módokra nézve. Ennek a fenotípusnak a létrejöttét eddig gibberellin bioszintézissel kapcsolatos eltérésekkel tudták azonosítani. Az általunk vizsgált *tti* paprika az elfekvő szárat tekintve alkalmasnak tűnik vertikális termesztésre.

A kísérlet elvégzéséhez szükséges MS táptalaj elkészítése volt az első lépés. A kísérlet végzése közben nagy hangsúlyt fektettem a sterilitásra, hogy zavartalanul fejlődhessenek a növények. Nevelésük az optimális életkörülményeket biztosító fitotronban és növényszobában történt.

A kísérletet *tti* és Fehérözön *in vitro* csíráztatásával kezdtem, majd az első szikleveles korban mindkét növényből *hypocotyl* és *cotyledon* explantumokat helyeztem újra a táptalajra; A kontrollként használt Fehérözönt kizárólag hormonmentes MS-re, míg *tti*-t különböző mennyiségű (1-4 mg/l) BAP-ot tartalmazó MS táptalajra is. A hormonmentes táptalaj esetében a *tti* számottevő gyökeresedést mutatott, míg a Fehérözön egyáltalán nem növesztett

gyökeret, ebből arra következtettem, hogy a *tti*-ban magas az auxin szint. A hormonnal kiegészített táptalajok eredményeiből kidolgozható egy optimalizált mikroszaporítási protokoll *tti*-ra.

Az *in vitro* mikroszaporítással létrehozott növényeket steril körülmények közti nevelés után fokozatos szoktatással sikeresen akklimatizáltam. A kiültetett növényeken 3-4 leveles állapotban lett megfigyelhető a csavarodó szár és a megnyúlt internódium.

7.Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném hálámat kifejezni konzulensem, Pápai Bánk felé, amiért részt vehettem a kísérletben és mindig számíthattam tőle útmutatásra, segítségre, akár a szakdolgozaton túl mutató szakmai kérdésekben is. Szeretném megköszönni Dr. Veres Anikónak, hogy társtémavezetőként segédkezett a dolgozat elkészítésében, illetve a megragadó Genetika előadásokat, melyek hatására már első egyetemi évemben elhatároztam, hogy ebbe az irányba szeretném terelni tanulmányaimat hosszú távon.

Hatalmas köszönet illeti édesanyámat, Becző Erikát, aki mindig pozitív mintaként szolgált számomra, támogatott és segítségével lehetőségem volt nyugodt körülmények között foglalkozni a szakdolgozattal. Köszönöm kisfiamnak, Dombi Marcellnek, hogy folyamatos motivációként szolgált. Szeretném még megköszönni férjemnek, Dombi Ádámnak a kiváló hallgatóságot lelkes szakmai beszámolóimhoz.

Köszönöm továbbá a MATE Genetika és Biotechnológia Intézet, Genetika és Genomika Tanszékének, hogy biztosította a lehetőséget a kísérlet elvégzéséhez.

8.Irodalomjegyzék

- Arimboor, R. - Natarajan, R. B. - Menon, K. R. - Chandrasekhar, L. P. - & Moorkoth, V. (2015): Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1258–1271. DOI: 10.1007/s13197-014-1260-7
- Berke, T. - Shieh, S. C. (2000): Chilli peppers in Asia. *Capsicum & Eggplant Newsletter*, (19), 38-41.
- Bosland, P. W. (2016): Hot stuff—do people living in hot climates like their food spicy hot or not?. *Temperature*, 3(1), 41-42. DOI: 10.1080/23328940.2015.1130521
- Brault, M., & Maldiney, R. (1999). Mechanisms of cytokinin action. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(5), 403-412. DOI: 10.1016/S0981-9428(99)80046-1
- Butt, S. J. - Varis, S. - Nasir, I. A. - Sheraz, S. - Shahid, A. (2015): Micro propagation in advanced vegetable production: a review. *Advancements in Life Sciences*, 2(2), 48-57.
- Carlson, E. A. (2011): *Mutation: The history of an idea from Darwin to genomics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cassells, A. C. (1997): *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Dordrecht: Springer Dordrecht.
- Christopher, T. - Rajam, M. V. (1994): In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(1), 25–29. doi:10.1007/bf00034439
- Cosgrove, D. J. - Sovonick-Dunford, S. A. (1989): Mechanism of gibberellin-dependent stem elongation in peas. *Plant Physiology*, 89(1), 184-191. DOI: 10.1104/pp.89.1.184
- Crosby, K. M. (2008): Pepper. *Vegetables II*, 221–248. doi:10.1007/978-0-387-74110-9_6
- Cleland, R. - Rayle, D. L. (1978): Acid-Growth Theory-Supporting evidence obtained from soybean hypocotyl sections. *Plant Physiology* 61(4), 43-43.
- Csilléry G. (2021): “ALKALMASAK-E A *tti* ÉS A *Pcx* MUTÁNSOK A DÖNTÖTT SZÁRÚ PAPRIKATERMESZTÉSRE?” In: Karsai I. - Bóna L. - Veisz O. - Polgár Zs. - Mihály R. - Balla K. (szerk.): *XXVII. Növénynevelési Tudományos Napok: Összefoglaló kötet*. Martonvásár: ELKH Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet. 66 p. pp. 47. , 1 p.
- Csilléry G. - Ruskó J.- Pápai B. - Kovács Zs. - Fári M. - Szamosi Cs.(2023): A *tti* ÉS *Pcx* GÉNEK ALKALMAZÁSA AZ ÁMPOLNA TÍPUSÚ PAPRIKA FAJTÁK NEMESÍTÉSE SORÁN In: Karsai I. - Pauk J. - Veisz O. - Polgár Zs. - Bóna L. (szerk.): *XXIX.*

- Növénynevelési Tudományos Napok : Összefoglaló kötet.* Martonvásár: MTA Agrártudományi Kutatóközpont. 158 p. pp. 118-118. , 1 p.
- Csilléry, G. (2006). Pepper taxonomy and the botanical description of the species. *Acta Agronomica Hungarica*, 54(2), 151-166.
- Davière, J. M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147-1151. DOI: 10.1242/dev.087650
- Debbarama, C. - Khanna, V. K. - Tyagi, W. - Rai, M., - Meetei, N. T. (2013): Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in Capsicum. *Agrotechnology*, 11(3), DOI: 10.4172/2168-9881.S11-003
- De Candolle, C. (1894) Three New Species of Mexican Plants.-Guarea Palmeri. *Botanical Gazette* 19(1),39-40.
- Fari, M. (1986): Pepper (*Capsicum annuum* L.). In Bajaj, Y. P. S.(szerk.) : *Crops I* .Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 345-362
- Fári, M., - Czakó, M. (1981): Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyl explants cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, 15(3), 207-213. DOI: 10.1016/0304-4238(81)90028-5
- Frankenberger Jr, W. T., Arshad, M. (1995). *Phytohormones in soils microbial production & function*. Boca Raton: CRC Press
- Gunay, A. L., - Rao, P. S. (1978): In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Science Letters*, 11(3-4), 365-372. DOI:10.1016/0304-4211(78)90024-X
- Gupta, C.G. - Lakshmi N. - Srivalli, T. (1998): Micropropagation studies on a male sterile line of *Capsicum annuum* L. at Nagarjuna University. *Capsicum and Eggplant Newslett.* 17, 42–45.
- Harberd, N.P. - King, K.E. - Carol, P. - Cowling, R.J. - Peng, J.R. - Richards, D.E.(1998): Gibberellin: inhibitor of an inhibitor of... ? *BioEssays*,20,1001–1008. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(199812)20:12<1001::AID-BIES6>3.0.CO;2-O
- Hedden, P. - Sponsel, V. (2015): A century of gibberellin research. *Journal of plant growth regulation*, 34, 740-760. DOI: 10.1007/s00344-015-9546-1
- Hussain, S. M. - Hussain, K. - Malik, A. A. - Hussaini, A. M. - Farwah, S. - Rashid, M. - Ahmad, R. (2021):Development of a novel in-vitro protocol for micro propagation of tomato male sterile line (Shalimar FMS-1) of Kashmir Valley India. *Acta Scientific Agriculture*, 5(4). DOI: 10.31080/ASAG.2021.05.0971
- Jones, H. A., Rosa, J. T. (1928): *Truck Crop Plants*. New York: McGraw-Hill

- Katz, E. (2009). Chili Pepper, from Mexico to Europe: Food, imaginary and cultural identity. *Estudios del Hombre, Serie Antropología de la Alimentación. Food, Imaginaries and Cultural Frontiers. Essays in Honour of Helen Macbeth. Guadalajara, Mexico: Universidad de Guadalajara*, 213-232.
- Khan, H. - Siddique, I. - Anis, M., - Khan, P. R. (2011). In vitro organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annuum* L. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 20, 84-89. DOI: 10.1007/s13562-010-0029-y
- Koch, R. (1882): *Die aetiologie der tuberkulose*. Berlin: Georg Reimer
- Kumar, O. A. - Anitha, V. - Subhashini, K. R. - Rao, K. R. (2001): Induced morphological mutations in *Capsicum annuum* L. *Capsicum & Eggplant Newsletter*, 20, 72-25.
- Lanahan, M. B., & Ho, T. H. D. (1988). Slender barley: a constitutive gibberellin-response mutant. *Planta*, 175, 107-114. DOI: 10.1007/BF00402887
- Lantos F.(2018): *Capsicum genus: „A paprika fajok eredete”* . Szentes: Szentes Városért Közalapítvány
- Ma, W.J. - Mi, S.E. - Li, B. (1991): Study on subculture media for rapid propagation of *Capsicum annuum* L. var. longum. *Gansu Nongye Daxue Xuebao* 26, 409-416.
- Martin, D. N., Proebsting, W. M., & Hedden, P. (1999). The SLENDER gene of pea encodes a gibberellin 2-oxidase. *Plant Physiology*, 121(3), 775-781. DOI: 10.1104/pp.121.3.775
- Menyhárt, K. (2021): *Magyarországi bolgárok-Néprajz, nyelv, gazdaságtörténet*. Budapest: Bolgár Kulturális Fórum
- Mitykó, J. - Gémes Juhász, A. (2006): Improvement in the haploid technique routinely used for breeding sweet and spice peppers in Hungary. *Acta Agronomica Hungarica*, 54(2), 203-219. DOI: doi.org/10.1556/AAgr.54.2006.2.8
- Muday, G. K. (2001): Auxins and tropisms. *Journal of plant growth regulation*, 20(3). DOI: 10.1007/s003440010027
- Murase K - Hirano Y - Sun TP - Hakoshima T (2008): Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456,459–463. DOI: 10.1038/nature07519
- Murashige, T. - Skoog, F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. DOI:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Pápai, B. - Kovács, Z. - Tóth-Lencsés, K. A. - Bedő, J. - Csilléry, G. - Veres, A. - Szőke, A. (2023). Evaluation of Abnormal Hypocotyl Growth of Mutant *Capsicum annuum* Plants. *Agriculture*, 13(2), 481. DOI: 10.3390/agriculture13020481

- Regner, F. (1996): *Anther and microspore culture in Capsicum*. In *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 3—Important Selected Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Rogo, U. - Fambrini, M. - Pugliesi, C. (2023): Embryo Rescue in Plant Breeding. *Plants*, 12(17), 3106. DOI: 10.3390/plants12173106
- Sanatombi, K. - Sharma, G. J. (2006). In vitro regeneration and mass multiplication of *Capsicum annuum* L. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 4(1), 205. DOI: 10.1007/s10535-008-0100-x
- Sanatombi, K. - Sharma, G. J. (2007): Micropropagation of *Capsicum annuum* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35(1), 57. DOI: 10.15835/nbha351253
- Sánchez, M. A. - Coronado, Y. M. - Coronado, A. C. M. (2020): Androgenic studies in the production of haploids and doubled haploids in *Capsicum* spp. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 73(1), 9047-9056. DOI: 10.15446/rfnam.v73n1.76044
- Saxena, P. K. - Gill, R. - Rashid, A. - Maheshwari, S. C. (1981): Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering in vitro. *Protoplasma*, 108, 357-360. DOI: 10.1007/BF02224429
- Schmülling, T. - Schäfer, S. - Romanov, G. (1997). Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 505-519. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03055.x
- Schwann, T. (1893): *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen*. Berlin : Verlag der Sander'schen Buchhandlung
- Shu, Q. Y., Forster, B. P., Nakagawa, H. (2012): Principles and applications of plant mutation breeding. In Shu, Q. Y., Forster, B. P., Nakagawa, H.: *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford UK: CABI. pp. 301-325. DOI: 10.1079/9781780640853.03
- Sigurbjörnsson, B. (1983): Induced mutations. In: Wood, D. R.: *Crop breeding*. Madison: American Society of Agronomy. pp. 153-176. DOI 10.2135/1983.crobreeding.c8
- Song, J. - Sivanesan, I. - An, C. - Jeong, B. (2009). Micropropagation of paprika (*Capsicum annuum*) and its subsequent performance in greenhouse cultivation. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 27(2), 293-298.
- Steinitz, B. - Wolf, D. - Matzevitch-Josef, T. - Zelcer, A. (1999): Regeneration in vitro and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.): The current state of art. *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 18(1), 9-15. DOI: 10.1007/s11738-002-0049-x

- Steward, F. C. - Ammirato, P. V. - Mapes, M. O. (1970): Growth and development of totipotent cells: Some problems, procedures, and perspectives. *Annals of Botany*, 34(4), 761-787. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084408
- Sun, X. - Shu, J. - Ali Mohamed, A. M. - Deng, X. - Zhi, X. - Bai, J., - Li, J.: (2019). Identification and characterization of EI (Elongated Internode) gene in tomato (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2204. 10.3390/ijms20092204
- Tanksley D.S. (1984): High rates of cross-pollination in Chile pepper. *HortScience* 4, 580-582.
- Theologis, A. - Huynh, T. V. - Davis, R. W. (1985): Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *Journal of molecular biology*, 183(1), 53-68. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90280-3
- Tóbiás I. - Salánki K. - Almási A. - Timár Z. - Palkovics L - Csilléry G. (2014): Rezisztencia források keresése a paprika TSWV rezisztenciát áttörő törzsével szemben. In, 449–53. Budapest: MTA Agrártudományok Osztályának Növénynevelési Tudományos Bizottsága. <http://real.mtak.hu/20148/>.
- Van der Linde, P. C. G. - Bouman, H. - Mennes, A. M. - Libbenga, K. R. (1984): A soluble auxin-binding protein from cultured tobacco tissues stimulates RNA synthesis in vitro. *Planta*, 160, 102-108. DOI: 10.1007/BF00392857
- Virchow, R. (1860): *Cellular pathology : as based upon physiological and pathological histology; twenty lectures delivered in the Pathological Institute of Berlin during the months of February, March, and April, 1858 / by Rudolf Virchow; translated from the second edition of the original by Frank Chance; with notes and numerous emendations, principally from ms. notes of the author*. London: John Churchill
- Wang, P. J. - Charles, A. (1991): Micropropagation through meristem culture. In Bajaj, Y. P. S.: (szerk): *High-Tech and Micropropagation I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 32-52.
- Zatyko, J. M. - Simon, I. - Szalay, I. - Molnar, I. (1982): Mixed culture of callus homogenates of different plant species in vitro. In *Plant tissue culture 1982: proceedings, 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at Tokyo and Lake Yamanake, Japan, July 11-16*
- Zatykó, L. (2021): Szóbeli közlés. Orosháza. „A paprika nemesítés történeti áttekintése.”

9. Ábrák jegyzéke

1. ábra: Paprika növény termésének változatos megjelenési formái. 2.1.2 fejezet, 5. oldal
2. ábra: A világ paprika termőterületének változása az elmúlt évekre vetítve. 2.1.3 fejezet, 6. oldal
3. ábra: Európa paprika termőterülete 2011-2021 (FAO) 2.1.3 fejezet, 7. oldal
4. ábra: Magyarország paprika termőterülete 2012-2022 között a KSH adatai alapján. 2.1.3 fejezet, 8. oldal
5. ábra: Táptalajra helyezett magok. 3.5 fejezet, 19. oldal
6. ábra: Cotyledonok a táptalajon. 3.6 fejezet, 20. oldal
7. ábra: Leválasztott hypocotylók a táptalajon, 3.6 fejezet, 21. oldal
8. ábra: Az állomány egy része, amely sikeresen elérte az első szikleveles formát. 4.1 fejezet, 22. oldal
9. ábra: Első szikleveles fejlettségű növények közelről a petri csészében, 4.1 fejezet, 23. oldal
10. ábra: hormonmentes MS tápalajon fejlődő Fehérözön és *tti* explantumok (2 hetes állomány). 4.2 fejezet, 24. oldal
11. ábra: Kallusz és hajtás fejlődés különböző explantumokból az egyes hormonkoncentrációk mellett. 4.3 fejezet, 25. oldal
12. ábra: Kallusz és hajtás megjelenése hormonnal kezelt explantátumokon. 4.3 fejezet, 26. oldal
13. ábra: Leválasztott kalluszok és hajtások üvegben. 4.4 fejezet, 27. oldal
14. ábra: Regenerált növények az üvegben. 4.4 fejezet, 27. oldal
15. ábra: Akklimatizált *tti* növény; a mutáns fenotípus idővel egyre jobban megfigyelhető. 4.5 fejezet, 29. oldal

10.Függelék

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

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Beczó Abigél
A Hallgató Neptun kódja: VPSN6J
A dolgozat címe: Tortuosis internode (ti) mutáns paprika vadl in vitro
A megjelenés éve: 2023 analízise, minőségvizsgálati kísérlete
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/portfólió² 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 állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

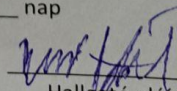
A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

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 repozitori 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 repozitori rendszerében.

Kelt: 2023 év október hó 06 nap


Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Becző Abigél (hallgató Neptun azonosítója: **VPSN6J**) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre

javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2023 év november hó 06 nap



belső konzulens