

DIPLOMADOLGOZAT

Pance Miklós Álmos
Mezőgazdasági biotechnológus

Gödöllő
2023



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Mezőgazdasági biotechnológus Szak**

**A KÍNAI KEL NARANCSSÁRGA MUTÁCIÓJÁNAK
ÁTVITELE KÁPOSZTAFÉLÉKBE EMBRYO-RESCUE
MÓDSZERREL**

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

Külső konzulens: Dr. Galli Zsolt, Czinege Dóra
növénynevelő,
Syngenta Kft.

Készítette: Pance Miklós Álmos
O8V4EY
nappali tagozat

Intézet/Tanszék: Genetika és Biotechnológia
Intézet, Genetika és Genomika
Tanszék

**Gödöllő
2023**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Célkitűzések.....	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1 Karotinoidok jelentősége	7
3.2 Káposztafélék termesztése és genetikai sajátosságai.....	8
3.2.1 Káposztafélék termesztése.....	8
3.2.2 A káposztafélék genetikai kapcsolata	9
3.3 Narancssárga mutációk káposztafélékben	10
3.4 Az embryo-rescue módszer	12
3.5 Kromoszómaszám meghatározás módszerei	14
3.6 Molekuláris markerek.....	14
3.7 Marker asszisztált szelekció (MAS)	16
4. Anyagok és módszerek.....	18
4.1 A keresztezések növényanyaga	18
4.2 Embryo rescue	19
4.3 Kromoszómafestés.....	20
4.4 A BrCRTISO1 gén öröklődésének nyomonkövetése	21
4.4.1 DNS izolálás	21
4.4.2 PCR körülmények.....	21
4.4.3 Agaróz gélelektroforézis:.....	23
5. Eredmények és értékelésük.....	24
5.1 Embriómentés	24
5.2 Kromoszómafestés eredményei	29
5.3 PCR vizsgálatok eredménye	35
6. Következtetések és javaslatok	39

6. Összefoglalás	41
7. Köszönetnyilvánítás.....	43
8. Irodalomjegyzék	44
9. Mellékletek	46

1. Bevezetés

A sokrétű küllemmel bíró és eltérő hasznosítású káposztafélék termesztése világviszonylatban a zöldségfélék között első helyet foglalja el. 10%-os részesedése a zöldségfélék között, a csoport változatossága mellett, tekintélyes eredménynek számít. A másodlagos anyagcseretermékek közül a β -karotin szerkezetünk számára nélkülözhetetlen molekula - az A-vitamin-prekuzora -, aminek egészségmegőrző szerepe bizonyított a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében, a nyálkahártya egészségének fenntartásában, továbbá a normál látás biztosításában. Zsírolékony molekula, emiatt étrendkiegészítő tabletták túlzott fogyasztásával túlléphetjük a szükséges mennyiséget, ezért könnyebb zöldségekkel bevinni a megfelelő karotinmennyiséget. Azonban a káposztafélékben felhalmozódó, másodlagos anyagcseretermékekkel foglalkozó kutatások száma korlátozott. Napjainkban a táplálkozási igény a minőségi ételek irányába tart, ami a beltartalmi értékeket egyre jobban előtérbe helyezi, így nemesítési célként tűzte ki Galli Zsolt egy olyan fejeskáposzta (*B. oleracea* – CC genom) létrehozását, amelynek belső leveleiben β -karotin halmozódik fel. Egy ilyen növény étrendünkbe illesztése hozzájárulhat egy egészségesebb életmód kialakításához.

A karfiolban (*B. oleracea* – CC genom) azonosított narancs mutáns gén (Crisp et al. 1975) átvitele evidens és egyszerű megoldást nyújtott volna, ugyanis egyazon fajba tartoznak és C genomot hordoznak. Azonban a keresztezésből származó növények esetén a gazdaságilag hasznos levelekben csekély, míg a torzsában nagy mennyiségű karotinoid felhalmozódás történt (Pongrácz 2021). A kínai kelben (*B. rapa* – AA genom) azonosított recesszív narancs gén a belső levelekben nagy mennyiségű karotinoidot halmoz fel a normál változathoz képest (Lee et al. 2014), így ennek a génnek az átvitele jelenthetné a megoldást a nemesítési cél elérésében. Mivel a *B. rapa* A genommal, a fejeskáposzta C genommal rendelkezik, így az F1 interspecifikus hibrid előállításnál embriómentés módszer alkalmazása elengedhetetlen. Ezt sikeresen végrehajtottuk, az F1 növényünk karalábé-orankin hibrid lett (Szűcs 2015). Az F1-et további kijelölt keresztezésekben használva újabb egyedeket állítottunk elő (O2, O5, O8) (Pongrácz 2021). A kérdés, hogy az új hibridek és az öntermékenyített növények a nemesítés következő lépésében alkalmazhatóak-e, vagy nem, aminek eldöntése két részből tevődik össze. Az egyik, hogy hordozzák-e a mutáns narancs gént, a másik, hogy milyen genomot tartalmaznak. A narancs mutáns gén jelenlétét Bra-OR (Lee et al. 2014) és BolCRTISO1 (saját tervezésű) primerpárral elemezzük (Szűcs 2015),

míg a genomösszetétel meghatározása COS (Conserved Ortholog Set) markerek - A és C genom specifikus fragmentumot szaporítanak fel - (Jeong et al. 2014) segítségével fog történni. Továbbá gyökércsúcs merisztéma szövetmintából kiindulva káposztafélékre adaptálva kromoszómafestéses vizsgálatot végeztünk, melynek segítségével a későbbiekben - egyéb vizsgálatok mellett -, a regenerált növényeket kariotipizálhatjuk.

2. Célkitűzések

A Syngenta Kft. és a MATE évek óta tartó narancssárga káposzta nemesítési programjához csatlakoztunk, amelyben a kínai kelből (AA genom) származó recesszív CRTISO1 gént szeretnénk átvinni a káposzta (CC genom) természetett változataiba; melynek következtében a növényeink nagy mennyiségű karotinoidot fognak felhalmozni.

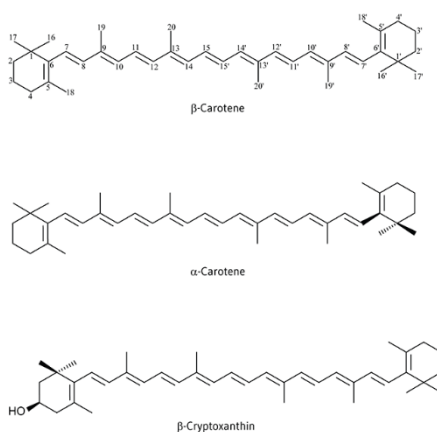
A kitűzött céljaink:

1. A kijelölt ivaros keresztezéséből származó becők sterilizációja és a bennük fejlődő magkezdemények izolálása, „embryo rescue” táptalajra helyezése és növényregenerálás.
2. Gyökércsúcs merisztéma sejtek festése, majd ezen sejtek segítségével kromoszómaszám meghatározása a „Bridge” és a keresztezéssel létrehozott, embriómentett növényekben. Ennek segítségével értékelni tudjuk az adott növények további nemesítési alapanyagként történő felhasználhatóságát.
3. A narancssárga színért felelős CRTISO1 gén jelenlétének ellenőrzése Bra-OR és BolCRTISO1 primerekkel a regenerált növényekben.
4. A sikeresen regenerált és a Bridge növények molekuláris vizsgálata COS (Conserved Ortholog Set) markerekkel.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Karotinoidok jelentősége

A karotinoidok egy jellemzően 40 szénatomból álló tetraterpenoidok (1. ábra) alkotta vegyületek gyűjtőneve (Abdulkerim et al. 2022), ami egy széleskörűen vizsgált, tanulmányozott vegyületcsoport. Zsírban oldódik, narancssárga, vörös színt biztosít a növényeknek. Ezt a konjugált kettős kötéseknek köszönheti, a növényekben fontos szerepet tölt be a fotoszintézisben. A karotinok különböző típusai elektronszállítóként vesznek részt a fotoszintézis antenna rendszerében, továbbá túlzott fényerősség esetén a fotoszintetikus apparátus védelmében segítenek az antioxidáns hatás révén (Niyogi 1999). Ebbe a csoportba tartozó vegyületek többek között: az α -karotin, a xantofillok, a likopin és a béta-karotinoidok, mint a lutein és a zeaxantin (Shilpaet al. 2020).



1. ábra: Az α -karotin, a β -karotin, és a β -kriptoxanthin szerkezete (Higdon, 2004)

Az emberi szervezet nem képes előállítani karotinoidokat, azonban rengeteg növény, néhány baktérium és gomba is termel ilyen vegyületeket. Számos változata közül alig 50 féle karotinoidot fogyasztunk, ennek ellenére csak néhány található meg belőle kimutatható mennyiségben az emberi véráramban. Bizonyos karotinoidok A-vitamin prekursorok a vékonybélbe jutva alakulnak át a szervezet számára esszenciális vegyületté. Az A-vitamin jótékony hatása ismert a szem egészségének megőrzésében, az immunrendszer megfelelő működésének elősegítésében és a sejt differenciálódásban. A karotinoidok rendkívül fontos antioxidáns hatással is rendelkeznek a reaktív oxigéngyökök (ROS) megkötése mellett, így fogyasztásával redukálható a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázata. Csökkentheti a rák kialakulásának valószínűségét, az elhízást és a cukorbetegséget, ezért összességében

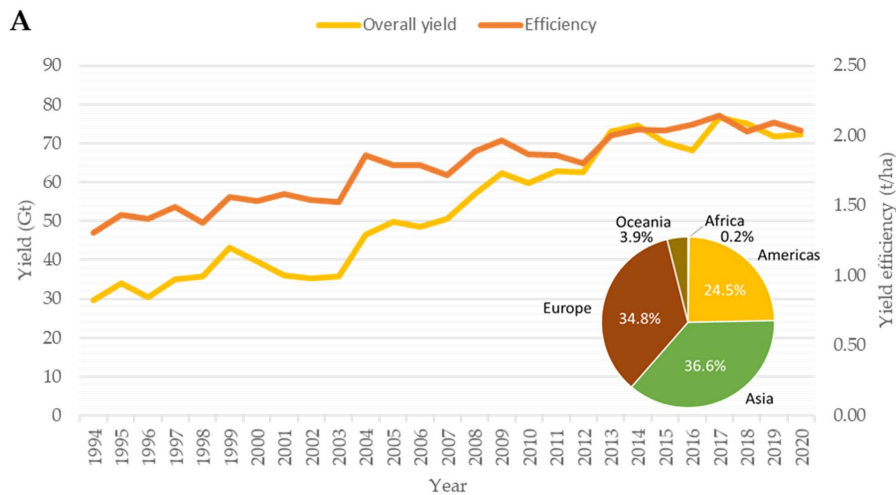
elmondható, hogy rendszeres fogyasztásával csökken a mortalitás (Abdulkerim et al. 2022). Jelenleg is zajló kutatások szerint a karotinok bizonyos változatai megfelelő dózisban adagolva képesek enyhíteni a koronavírus (COVID-19) okozta tüneteket, valamint ellenállóbbá tehetik a szervezetet a fertőzéssel szemben. A pontos klinikai hatás azonban még további kutatásokat igényel (Lu et al. 2022).

3.2 Káposztafélék termesztése és genetikai sajátosságai

3.2.1 Káposztafélék termesztése

A káposztafélék (*Brassicaceae*) családja, a keresztesvirágúak (*Brassicales*) rendjébe tartozó fajokat foglalja magába (María et al. 2021). Ezt a családot 340 nemzetségre, és 4636 elfogadott fajra lehet felosztani. Az egyik legfontosabb termesztett zöldségnövény csoportunk, figyelembe véve, hogy rendkívül fontos olajnövények és zöldségnövények tartoznak ide (Zandberg et al. 2022). Ezek közül számunkra a *Brassica* nemzetség tagjai a leglényegesebbek. Az ide tartozó számos növény elképesztő változatossággal bír, mind morfológiában, mind felhasználás szempontjából. A világ szinte minden táján a növények különböző részeit zöldségként fogyasztják, az étrend fontos részét képezik (María et al. 2021).

Az új káposztafajták, hibridek esetén az egyre optimálisabb termesztéstechnológiának köszönhetően az egy hektárról betakarított termés, azaz a hatékonyság is stabilan növekvő tendenciát mutatott egészen 2004-ig (2. ábra). Ekkor 79,7 milliárd tonna volt a káposztafélék össztermése, azóta enyhén csökkenő hozamokat (72.4 milliárd tonna) produkál a globális termelés. Ennek a visszaesésnek okai között szerepel a szélsőséges időjárás, a termőterületek csökkenése és egyéb ökonómiai hatások is (Zandberg et al. 2022). A Magyarországon betakarított fejeskáposzta mennyiségére is folyamatos csökkenés jellemző. A 2004-es közel 176 ezer tonnáról, 2005-re kevesebb mint 112 ezer tonnára csökkent a betakarított termés, míg 2021-re ez az érték a harmadára, azaz 37 ezer tonnára csökkent (http 2).

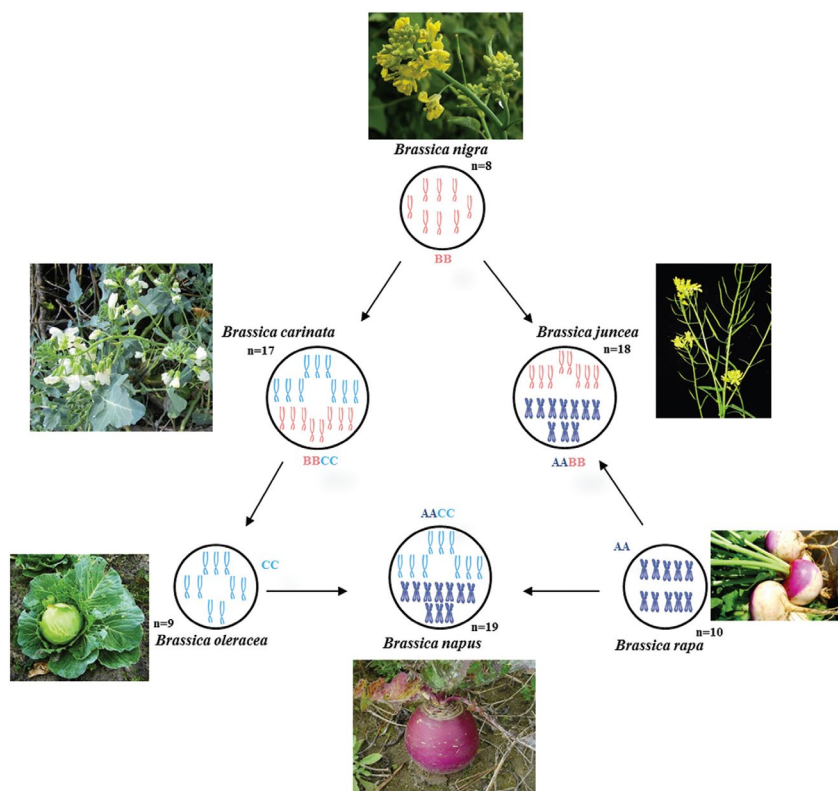


2. ábra: A káposztafélék globális termelése és a hektáronkénti termésmennyiség változása az elmúlt 30 évben (Zandberg et al. 2022)

3.2.2 A káposztafélék genetikai kapcsolata

A káposztafélékben a kiterjedt termesztés és a tudatos nemesítéskor alkalmazott szelekció eredményeként számos és nagyon változatos megjelenésű morfortípus jött létre a történelem során a Mediterráneumban. Ennek köszönhető, hogy gyakran különböző fajok tekintettek bizonyos változatokat a jelentősen eltérő morfológiájuk miatt, ilyen szinonimákra világítottak rá a molekuláris vizsgálatok. A különbözőségek ezen foka a genetikai diverzitásukban rejlik (María et al. 2021).

A *Brassica* fajok citogenetikai vizsgálata nélkülözhetetlen az interspecifikus hibridizációt követő visszakeresztezés sikerességének növelésében. A fajok kromoszómaszámának meghatározását Manton kísérte meg először. Fixálás után Heidenhain's vas-haematoxylinnal, majd Newton gentián ibolyával festette a kromoszómákat, ezzel a technikával 10 *Brassicaceae nemzetség* fajainak kromoszómaszámát határozta meg (Manton 1932). Megkerülhetetlen a *Brassica* fajok genetikai kapcsolatában az U-háromszög, melyet Nagaharu publikált. Kutatásai szerint három diploid faj, a *B. rapa* (AA genom) $2n=20$; a *B. nigra* (BB genom) $2n=6$; a *B. oleraceae* (CC genom) $2n=18$ és azok interspecifikus hibridizációjával létrejött három amfiploid fajait *B. juncea* (AABB genom) $2n=36$; a *B. napus* (AACC genom) $2n=38$ és a *B. carinata* (BBCC genom) $2n=34$ foglalja össze (3. ábra). Ezek a fajok a természetben, spontán kereszteződéssel jöttek létre (Nagaharu 1935).



3. ábra: A legfontosabb *Brassica* fajok genetikai kapcsolatát bemutató U-háromszög (Manu et al. 2015)

3.3 Narancssárga mutációk káposztafélékben

Narancssárga mutáció a karfiolban

A káposztafélében többféle narancssárga variánsal találkozhatunk, ezeknek a létrejötte különböző mutációkkal magyarázható. Karfiolban ismert lila sárga és zöld variáns is, azonban a piaci igény a legtöbb országban (kivételet képez ezek közül Olaszország) alacsony ezekre a fajtákra (Röth Fruzsina 2023, szóbeli közlés). 1971-ben egy normál, fehér karfiol veteményben fedeztek fel egy ismeretlen eredetű narancssárga példányt. A gén öröklődését vizsgálva, amely az eredeti narancssárga növény (aszéptikus körülmények között nevelt klónokat használva) hasadó populációjából bebizonyosodott, hogy egy egygénés féldomináns mutációról van szó, amely funkciónyeréshez vezetett és amit Or génnek neveztek el. Az eredeti növény heterozigóta és meglepő módon a kísérletben a narancs homozigóta egyedek rózsája, a heterozigóta társához képest jelentősen kisebb, satnyább, sötét narancssárga színű és nem piacos fenotípust mutattak (Crisp et al. 1975). Az Or-gén rendkívül szorosan kapcsolt a törpeségért felelős génnel, ami hatással van a szármegnyúlásra, a karfiolfaj méretére és a virágzás időpontjára is. Ez a ráhatás többek

között annak köszönhető, hogy az Or gén terméke szuppresszálja egy Eukaryotic release factor 1 (eRF1) nevű gén expresszióját (Zhou et al. 2010). A teljes genetikai oka azonban ezeknek a fentopípusos hatásoknak még nem ismert. Kezdetben a Daehnfeldt, majd egyesülésük után a Syngenta vállalatoknál sikerült kapcsolt molekuláris markerek segítségével megtörni a szoros kapcsoltságot a törpenövekedésért felelős lókusszal, így normál méretű, Or génre homozigóta domináns fajták már kaphatók kereskedelmi forgalomban (Galli et al. 2015). A funkcionyeréses narancs mutáció egy retrotranszpozon LTR régiójának beépülése miatt következett be egy plasztid-asszociált fehérjét meghatározó génben, ennek következtében jelentős mennyiségű karotin halmozódik fel a karfiolfejben (Zhou et al. 2010). Az EU-ban és Magyarországon különösen szigorú szabályozások vonatkoznak a génmódosítás és a génszerkesztés módszereire, így hagyományos technikákra hagyatkozhatunk csak. A legtöbb narancssárga színanyag termeltetésére irányuló kutatás, a karotin bioszintézis út biotechnológiai módszerekkel történő módosítására összpontosít (Sandmann 2001, Schmidt-Dannert 2000). Az Or gén introgresszálása más fajokba új utat nyithat a nemesítőknek, hogy hagyományos módszerekkel hozzanak létre új, jobb beltartalmi értékekkel rendelkező káposztaféléket (Shan et al. 2005).

A karfiolban található Or-gén átvitele fejeskáposztába kézenfekvő megoldásnak tűnt, figyelembe véve, hogy mindkét növény azonos fajba (*B. oleracea*) tartozik. Az interspecifikus hibridizáció nehézségei, többek között az eltérő kromoszómaszám okozta problémák így megkerülhetőek lettek volna. Sajnálatos módon a létrehozott Or mutációt hordozó vonalakban és hibridekben csak a torzsában halmozódtak fel karotinoidok, a gazdaságilag jelentősebb belső levelekben csak kisebb mértékben (Galli 2022, szóbeli közlés).

Narancssárga mutáció a kínai kelben

A kínai kel (AA) latin nevén a *Brassica rapa L. ssp. pekinensis*. Ahogy a neve is mutatja egy Kínából származó káposztafélé, amit világszerte fogyasztanak, felhasználása sokrétű, belőle készül a tradicionális koreai étel a kimchi. Fogyasztása pozitív hatással van az egészségre magas antioxidáns, C-vitamin és az egyéb nyomelem tartalma miatt (Podsdek 2007). Többféle változata létezik, a belső levélszíne lehet fehér, sárga, vagy akár narancssárga is. Ez utóbbi szint a levelekben felhalmozódó α -karotin, β -karotin és likopinnek köszönheti (Li et al. 2015). A variánst úgy hozták létre, hogy a kínai kelt tarlórépával keresztezték, ezután pedig visszakeresztezéseket végeztek (Watanabe et al.

2011). A kísérletek során bebizonyosodott, hogy a kínai kelben egy egygénés recesszív mutáció az, ami a narancssárga színért felelős tulajdonságot okozza (Feng et al. 2012). A molekuláris vizsgálatok és a markerfejlesztés eredményeként a gén térképezése során sikerült behatárolni három génjelöltet kapcsolt markerekkel, amelyek közül az elemzés után bizonyították, hogy a BrCRTISO1 felelős a tulajdonságért (Zhang et al. 2013). A rövidítés a *Brassica* és a karotinoid izomeráz enzim nevéből származik. Ha az enzim nem működik megfelelően, akkor prolikopin, policisz-karotin és likopin prekursorok halmozódnak fel a transzlikopinok helyett, ennek köszönhető az elszíneződés a kel belső leveleiben (Li et al. 2015).



4. ábra: A sárga belső levelű (a, b, c) és a narancssárga belső levelű (d, e, f) kínai kel belső levelei és virága, vágás után közvetlenül (a, d) és 10 perc elteltével (b, e) (Lee et al. 2014).

A karotin bioszintézist erőteljesen szabályozza a fény és a hőmérséklet. Megfigyelhető, hogy a belső levelek a narancssárga színt 10 perc direkt napfény hatására expresszálják (4. ábra). Ez a jelenség annak köszönhető, hogy a hibásan működő BrCRTISO1 enzim miatt napfény hiányában a prolikopin nem tud átalakulni likoppinná. Napfény hatására azonban alternatív úton lejátszódik a reakció és létrejönnek a narancssárga színért felelős színanyagok (Tongbing et al. 2015).

3.4 Az *embryo-rescue* módszer

A növényi embriók magukban hordozzák a potenciált, hogy a megfelelő körülmények között, belőlük növény fejlődhessen. Ennek ellenére vannak olyan szituációk – többek között az endospermium rendellenes növekedése, vagy a távoli hibridizáció–,

amikor ez nem lehetséges. Távoli keresztezés során gyakran előfordul, hogy az embrió abortálódik, emiatt nem jön létre életképes mag. Ilyen esetekben tud segítségünkre lenni az embriómentés módszere. Célunk, hogy a fejletlen embriót a termésből kipreparáljuk, majd az embrió számára megfelelő körülmények (táptalaj, hormonok, hőmérséklet, fényintenzitás) között csírázásra készítjük a növényt. A legelső próbálkozások a XVIII. századra datálhatók. *Phaseolus* és *Fagopyrum* termésekből magkezdeményeket metszettek ki, majd talajba ültették, azonban a növények, amelyek kihajtottak, törpenövésűek maradtak. Brown és Morris 1890-ben folyékony tápoldatokkal kísérletezett, de az igazi áttörést Hannig hozta el azzal, hogy az oldathoz különböző sókat és cukrot adott és a növényeket aszeptikus körülmények között tartotta, majd sikeresen regenerálta. Azóta komoly előrelépések történtek a táptalaj összetételét illetően. Fény derült a különböző nitrogéntartalmú vegyületek fontosságára, továbbá, hogy cukor hozzáadása nélkül az embrió fejlődése nem lép túl a protokorn stádiumon. A táptalajok további összetevői lehetnek többek között természetes adalékanyagok, mint például a kókusztej, ami nem más, mint a kókusz magjának folyékony endospermiuma, továbbá fontos összetevők még a növekedést szabályozó hormonok (Sharma et al. 1996).

Az embrióknak két alapvető stádiumát különböztetik meg a tápanyagellátás tekintetében: a heterotrófot és az autotrófot. A termékenyítéstől a szív stádiumig a heterotróf, a késői szív stádiumtól kezdődően az autotróf állapot jellemző. A második stádiumban az embrió már képes az endospermium nélkül is az életben maradásra, ezért egyszerűbb táptalaj is elegendő, amellet, hogy így már kevésbé érzékeny az ozmotikus stresszre. Ezért is célszerű az embriómentést a lehető legkésőbb elvégezni (Rahman 2004). A *Brassica* fajok közötti inkompatibilitás mellett, a kétéves életciklus is nehezítő tényező a konvencionális nemesítési technikákban. A keresztezés alacsony hatékonysága ellenére, sikeres megtermékenyítés esetén az utód tulajdonságaiban és genetikai állományában magasfokú varianciát mutat, emellet változó összetételt a szülői genotípusok tekintetében. Ennek következménye, hogy az magkezdemények hamar, 10-15 DAP (days after pollination – beporzás utáni napok száma) már abortálódhatnak. A *Brassica* embriók a megfelelő fejlődés érdekében különböző aminosavakat és vitaminokat is igényelnek. Csírázást követően a MS, vagy $\frac{1}{2}$ MS táptalajra helyezhetők a növény igényeinek megfelelően, majd akklimatizálást követően kiültethetők (Ripa et al. 2020).

3.5 Kromoszómaszám meghatározás módszerei

A növényi kromoszómák mérsékelten kutatott terület, ellenben az állatok és emberek terén folytatott kutatások sokkal előrehaladottabbak, ennek oka olyan nehézségek, mint a növényekben található vastag, merev sejtfal. A növényfajok nagyjából 25%-nak sikerült meghatározni a kromoszómaszámát, azonban ezek az értékek sem tökéletesen bizonyító erejűek, tekintetbe véve a vizsgált minták és populációk alacsony (többnyire 1) számát. Levitskii 1931-ben publikált egy úttörő technikát, mellyel fixálni és festeni lehetett a kromoszómákat. Az Ő nevéhez fűződik a kariotipizálás és a kariotípus fogalma, ami nem más, mint olyan tulajdonságok összessége, amelyekkel leírható és beazonosítható egy adott kromoszómakészlet. Ilyen tulajdonságok a kromoszómák száma és mérete, a formája, a centroméra elhelyezkedése stb. Vannak egy színnel festő technikák, ilyen a kárminecetsav, az orcein vagy a Feulgen festés. Ezen egyszerűbb eljárásokkal alapszintű kariotipizálás elvégezhető, de nem tudunk különbséget tenni a heterkromatin és az eukromatin között. Az erre alkalmas technikák többek között a „Q-banding” és a „G-banding”. Ezek a módszerek fluoreszcens jelölésre alapulnak, bonyolultabb protokollal és nagyobb kiadásokkal járnak és több időbe is telik elvégezni a kísérletet. Nagy előrelépést jelentett a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) és a genomi *in situ* hibridizáció (GISH). Ezek a módszerek izolált vagy szintetizált DNS próbákra alapulnak, amik fluoreszcensen jelöltek. A próbákat ezután a kromoszómákkal hibridizáltatják majd a jel alapján meghatározható, hogy az adott DNS szakasz melyik kromoszómán, azon belül melyik lókuszon található. A GISH módszerrel megkülönböztethető, hogy a keresztezésekben melyik szülőtől származnak a kromoszómakészlet különböző részei. Ezek a módszerek szintén komplexek amellet, hogy idő- és eszközigényük, továbbá a költségük is jelentős (Zoshchuk et al. 2002).

3.6 Molekuláris markerek

A markereket arra használjuk, hogy egyértelműen meghatározzunk, leírjunk és különbséget tudjunk tenni különböző élőlények között. Rengetegféle marker létezik (morfológiai, citológiai, biokémiai), ezek közül a munkánkhoz legalkalmasabb DNS alapú markereket használtuk.

A DNS alapú markerek a szekvenciára, annak variációira, mutációira alapulnak, így lehet velük polimorfizmust kimutatni. Az ideális marker az alábbi tulajdonságokkal rendelkezik:

- Egyenletes polimorfizmus
- Egyenlő eloszlás a genomban
- Kodomináns öröklődés
- Könnyű detektálhatóság
- Olcsó
- Megismételhető, laborok között könnyen megosztható
- Nincs pleiotropikus hatása
- Genom specifikus

Természetesen a valóságban nem létezik ilyen tökéletes marker. Sok esetben a különböző markertechnikák kombinációját kell használnunk az optimális eredmény érdekében (Kiss 1991). A legtöbb (és az általunk használt) markertechnika PCR (polymerase chain reaction) alapú. A PCR a sejtekben természetesen lejátszódó folyamatot imitál. Ezen reakció során a DNS mintát, primerek, DNS polimeráz enzim, a DNS felépítőkövei a dNTPk, és puffer keverékével elegyítjük, ezt követően a PCR gépbe helyezzük, ahol változó hőmérséklet és időciklusok során DNS fragmentumok szaporodnak fel. A PCR terméket interkalálódó festéket tartalmazó agaróz vagy poliakrilamid gélen elválasztva vizsgáljuk.

Molekuláris markerek közül első volt az RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) technika, amely restriktív endonukleázokkal történő emésztés után változatos mintázatot hoz létre különböző fajokban. Az RFLP technika azonban komplikált, veszélyes anyagok és röntgen sugárzás is szükséges hozzá, emellett megismételhetősége igen nehézkes, így a kutatók más DNS alapú markertechnikákhoz fordultak. A RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) az első PCR alapú technika, ami véletlenszerű szekvencia sorrendű primerek használatán alapul. Az alacsonyabb polimorfizmus és a domináns jellege miatt nem kifejezetten alkalmas a MAS-ra, emellett a rövidebb (10 nukleotid) primerek miatt az ismételhetőség is nehézkes. Az SSR (Simple sequence repeats) technika, az ismétlődések két végén lévő konzervált régiókra tervezett primerekkel indított PCR vizsgálat. A polimorfizmus oka a tandem ismétlődések számában való különbségek, amelyek az ampliconok hosszúságában jelentkeznek. Kodomináns marker, az allélméreték meghatározhatóak, többek között Automata lézer fluorométerrel (ALF) és kapilláris elektroforézissel is. Megbízható technika, ráadásul magas szintű polimorfizmussal is rendelkezik. Az SNP (Single Nucleotide Polymorphism) a genom egy nukleotidjában bekövetkező változás. Általában két lókuszosak, mert kevés az esély arra, hogy a genomban kétszer pont ugyanazon a helyen jöjjön létre mutáció, ráadásul mindkét esetben különböző bázisra történő cserével. Ellenben rendkívül nagy mennyiségben, egyenletes eloszlásban

megtalálhatóak a növényi genomban és kodominánsan öröklődnek. Kimutatásukra változatos módszerek állnak rendelkezésre. Emellett az újgenerációs szekvenálási technikák és az egyre növekedő genom adatbázisok is komoly segítséget nyújtanak a nemesítési folyamatokban (Ben-Ari & Lavi 2012).

PCR alapú módszerrel specifikus primerpárokat használva, ismert gén (CRTISO1) szekvencia különbségei, polimorf DNS szakaszokat adnak eltérő fajokban és változatokban. Erre példa az alábbi két eset: a BR-OR primerpár esetén akkor számíthatunk fragmentumra, ha a kínai kel narancssárga színért felelős génje megtalálható a növény genomjában. A BolCRTISO1 primerpár egy *B. oleracea* specifikus CRTISO1 gén jelenléte esetén ad fragmentumot. (Szűcs 2015).

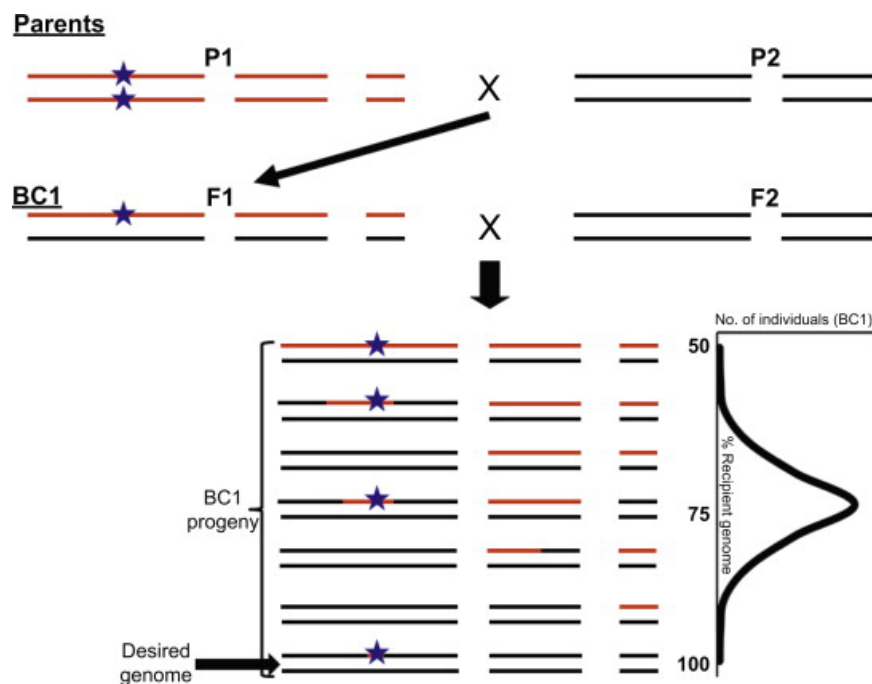
Az általunk is használt Conserved Ortholog Set (COS) marker szekvenspecifikus, génekre tervezett primer párokra alapul. Olyan gének alkalmasak ehhez a technikához, amelyek 1 kópiában találhatók meg a genomban. Fajok közötti összehasonlítást tesz lehetővé, legtöbbször családokon belüli vizsgálatokban szokták alkalmazni. Teljes genom szekvenciával rendelkező fajok esetén, bioinformatikai eszközök segítségével géneket kereshetünk, amelyek megfelelően konzerváltak a genomban. Emellett már leírt gének segítségével DNS próbákkal tesztelhetünk más faj genomjait. A megfelelő hibridizációhoz legalább 70%-os egyezés kell a két gén szekvenciájában (Fulton et al. 2002). Az ilyen egykópiás génekre fejlesztett markerek további előnye, hogy poliploid genomok vizsgálatára is alkalmas, mert az ortológ és paralóg egykópiás gén variációk között nem kell különbséget tennünk. A dinamikusan fejlődő szekvencia adatbázisoknak köszönhetően a *Brassica* fajokban is elérhetővé váltak a COS markerek (Jeong et al. 2014).

3.7 Marker asszisztált szelekció (MAS)

Az első próbálkozások markerek használatára a növénynemesítésben a 20. század elején zajlottak. Olyan gének, amelyek kifejeződését vizsgálni tudjuk és Mendeli öröklődéssel rendelkeznek, azokat markerként használhatjuk olyan gének szegregációjának vizsgálatára, melyek mennyiségi tulajdonságokért felelősek. Ilyenre példa a *Phaseolus vulgaris* termésének mérete és a színe és mintázata közötti összefüggés vizsgálata (Sax 1923). Később jelentős kutatások folytak a rezisztencianemesítésben, fontos előrelépés volt az a felfedezés, amiben rájöttek, hogy sok rezisztencia nem egygén tulajdonság. Napjainkban a megfelelő hatékonyságú növénynemesítés elképzelhetetlen a MAS nélkül. A hagyományos nemesítési módszerek önmagukban már nem képesek lépést tartani korunk

felgyorsult és egyre változóbb igényeivel. Elengedhetetlen tehát, hogy a programunkba beleépítsük a laboratóriumi, azaz a molekuláris vizsgálatokat. Kapcsolt molekuláris markerekkel a számunkra fontos tulajdonságokat és géneket követni tudjuk. A technika előnye abból származik, hogy bizonyos tulajdonságok nehezen felismerhetők, befolyásolja őket a környezet, továbbá vizsgálatuk magas munkaigénnyel rendelkezik. A molekuláris markerekre épített vizsgálatok, már a növény korai fenológiai stádiumában elvégezhetőek, így a számunkra nem megfelelő növényeket hamar és könnyen kisselektálhatjuk, ezzel erőforrást, helyet, időt és pénzt spórolhatunk meg. Azonban mindig érdemes figyelembe venni, hogy bizonyos esetekben a fenológiai vizsgálat egyszerűbb és olcsóbb lehet, mint a molekuláris tesztelés. Tekintetbe véve, hogy a markerfejlesztés során a megbízható kapcsoltságot mindig ellenőrizni és tesztelni kell, ami időigényes feladat (Ben-Ari & Lavi 2012).

A MAS segítségével hatékonyabban és gyorsabban érhetjük el a nemesítési célunkat. Ki tudjuk választani a megfelelő partnereket heterózis nemesítéshez és csökkenthetjük a backcrossok számát a kapcsolt markerek DNS alapú vizsgálatával a génpiramidálás és gének introgresszálása során (5. ábra) (Ben-Ari & Lavi 2012). A kísérletünk szempontjából ez utóbbi a legfontosabb annak érdekében, hogy az átvinni kívánt narancssárga színért felelős gén beépülését a genomba ellenőrizni tudjuk és az eredeti genotípus visszaállításához szükséges backcrossok számát és hosszát a lehető legjobban leredukáljuk.



5. ábra: Gén introgresszálása és a backcross, kék csillaggal jelölve a GOI (Ben-Ari & Lavi 2012).

4. Anyagok és módszerek

4.1 A keresztezések növényanyaga

A több éve zajló nemesítési program során keresztezéssel először sikerült létrehozni egy narancs kínai kel (AA) - karalábé (CC) F1 hibridet (AC), ami hímsterilnek bizonyult (szücs 2015). Ezt a növényt évek óta vegetatívan tartják fent. Időközben a növényen spontán megjelent egy fertilis oldalhajtás, az ebből felnevelt növény öntermékenyítésével sikerült létrehozni egy F2 populációt, melynek egyedei tetraploidnak (AACC) bizonyultak (Pongrácz 2021). Több kijelölt hibridizációból (O20, O21, O23, O28, O31, O39, O40, O41, O42, O43, O44, O45) (mellékletek 3. táblázat), csak kettő (O42 és O44) eredményezett becőket a kontroll keresztezés mellett (O2 Self), ezeket használva végeztünk embriómentést. A nemesítési programban résztvevő növényekről 2022 április 11.-én készült képeket a 6. ábra mutatja be.



6. ábra: A a szülőnek kijelölt növények balról jobbra haladva: F1-1, O2 (03.30), O8 (06.11), O8 (04. 20), O5 (05.11), O8 (07.09), O5 (04.27), O5 (03.01), O5 (05.04), F1-3, Brigde406, Bridge408, Bridge407, Orankin.

Megfigyelhető, hogy bizonyos genotípusok még nem virágzanak, ezek később lettek csak alkalmasak a keresztezésekre. Az 1. táblázat összefoglalva mutatja be a fent említett növények pedigréjét.

Keresztezés kódja	Anya	Apa
O2 (03.30)	steril F1-S (AC)	Bridge1
O5 (03.01)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-2 (AACC)
O5 (04.27)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-2 (AACC)
O5 (05.04)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-2 (AACC)
O5 (05.11)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-2 (AACC)
O8 (04. 20)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-1 (AACC)
O8 (06.11)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-1 (AACC)
O8 (07.09)	steril F1-S (AC)	Fertil tetraploid F2-1 (AACC)

1. táblázat: A szülő növények keresztezési adatai (Pongrácz 2021)

4.2 Embryo rescue

A keresztezésekből és az öntermékenyítésből származó becőket 7-14 DAP után a növényről leválasztottuk, megcímkézve műanyag zacskóba helyeztük, majd a laborba szállítást követően a lehető leggyorsabban megkezdtük a sterilizálásukat. Lamináris boxban aszeptikus körülmények között sterilizáltuk a becőket. A munkához használt fémeszközöket 70%-os etanolba mártás után gázégőbe tartva izzásig hevítettük, majd hagytuk kihűlni. A tüköt szintén 70%-os alkoholba mártottuk 10 másodpercig, majd leráztuk róla a maradék folyadékot. A lombikokat hőlégsterilizáló segítségével hoztuk csíramentes állapotba. A munka során minden alkalommal a boxba nyúlás előtt fertőtlenítettük a kezünket, csökkentve annak az esélyét, hogy befertőzzük a steril magkezdeményeket.

Becő sterilizálásra használt módszer a következő volt:

1. 70%-os alkoholba és 3:1-es hypoba felváltva, 10-szer, néhány másodpercig belemártottuk a becőket
2. Steril vízben 3-szor alaposan leöblítettük
3. Steril szűrőpapírra helyezve felitattuk a maradék folyadékot a becőkről

Ezt követően sztereó mikroszkóp alatt Petri csészében tűk segítségével óvatosan felnyitottuk a becőket, majd eltávolítottuk a benne található magkezdeményeket. Az éretlen magkezdeményeket ezután embryo-rescue táptalajra helyeztük (mellékletek 1. táblázat). A magkezdemények ezután fényszobába kerültek, ahol kontrollált körülmények között, 22 °C-on 16/8 (világos/sötét) órás megvilágítás mellett voltak tartva csírázásig. Kéthetente friss táptalajra helyeztük át a magkezdeményeket, egészen addig, amíg ki nem csíráztak, ezt követően fiolába öntött MS táptalajra kerültek át a növények (mellékletek 2. táblázat).

4.3 Kromoszómafestés

A festési eljárás, amit alkalmaztunk három fő lépésből állt:

1. A sejtosztódások szinkronizálása
2. Kromoszómafestési protokoll
3. Fénymikroszkópos vizsgálat

Az első lépésként az *in vitro* leszaporított, gyökereztető táptalajon növesztett növényeket óvatosan eltávolítottuk a szilárd táptalajból, majd 2-3 centiméteres darabot vágunk le a gyökércsúcsról és Eppendorf csőbe töltött csapvízbe helyeztük őket. Ezt követően jeges vízben, 4 °C-on legalább 8 óráig tároltunk, hogy a sejtekben zajló osztódási folyamatok lelassuljanak. A hűtőből való kivétel után szobahőmérsékleten tároltuk a csöveket, ami alatt újraindul a sejtciklus, majd a kísérletsorozat során beállított idő elteltével kezdtük el a festési eljárást.

A kísérlet során megállapított szinkronizálási idő elteltével pipettával eltávolítottuk a csapvizet és a következő protokollt hajtottuk végre.

Összetevők:

1. Clarke fixáló (96%-os etil-alkohol és jégecet 3:1 arányú keveréke)
2. Maceráló oldat (1N sósav és 96%-os etil-alkohol 1:1 arányú keveréke)
3. Desztillált víz
4. Chamberlain oldat (5% jégecet, 5% 40%-os formaldehid, 70% 96%-os etil-alkohol, 20% desztillált víz)
5. Acetokármin (110 ml desztillált víz, 90 ml jégecet, 2.5g carmin)

Az eljárás során az Eppendorf csőben elhelyezett gyökércsúcsokra rápipettáztuk az oldatokat, majd a megfelelő idő elteltével óvatosan leszívtuk róla a folyadékot, ezt követően pipettáztuk rá a következőt és így tovább. A megfelelően festődött gyökércsúcs merisztéma szövetet ezután sztereó mikroszkóp alatt, apró tűk segítségével leválasztottuk a gyökér

végéről és a tárgylemezre cseppentett Acetokárminba helyeztük. A fedőlemez óvatos ráengedése után, gyufaszál végével kopogtató mozdulattal szétnyomtuk a szövetet, létrehozva – ideális esetben – az egy sejtréteges mintát. A kész metszetet fénymikroszkóp alatt, különböző nagyításon vizsgáltuk. A legnagyobb felbontás érdekében, 100x-os nagyítás esetén immerziós olajat használtunk, a fedőlemezre cseppentettük az olajat, majd a lencsét óvatosan beleengedtük az folyadékba, figyelve arra, hogy a lencse ne érjen hozzá a fedőlemezhez és ne képződjön buborék a folyadékrétegben. Az arra érdemesnek látszó mintákat kanadabalzssammal vagy körömlakkal lezártuk.

4.4 A *BrCRTISO1* gén öröklődésének nyomonkövetése

4.4.1 DNS izolálás

A DNS kivonást a növények leveléből Macherey Nagel® NucleoSpin DNS kit segítségével végeztük a gyártó által megadott protokoll alapján. A DNS minta tisztaságát és koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. Szükség esetén hígítást végeztünk 20 ng/μl koncentrációra.

4.4.2 PCR körülmények

Célunk az volt, hogy az embriómentésből regenerált hibrid (O42 és O44) és kontroll (O2 self) növényekről meg tudjuk állapítani, hogy hordozzák-e a számunkra fontos kínai kel narancssárga színéért felelős mutáns *CRTISO1* gént.

Ehhez a BR-OR és a Bol*CRTISO1* primerpárt használtunk. A primer szekvenciák az alábbiak voltak (Szűcs 2015):

- Bra-OR- Forward (Bra031539-OC_MF1): 5'- GAGGTCTGTTTCTACGAGTACGG -3'
- Bra-OR- Reverz (Bra031539-OC_MR1): 5'- CTCATTAGTCCATCTCCGACCA -3'
- Bol*CRTISO1*- Forward: 5'- GGATATGCCCATCTTATTTGACC -3'
- Bol*CRTISO1*- Reverz: 5'- GCTCTCATGCAACGGAACAA -3'

Emellett a hibridek vizsgálatához genomspecifikus COS markereket is használtunk (Jeong et al. 2014):

- COS015- Forward: 5'- ATCAATGCGGTTGTGATGAT -3'
- COS015- Reverz: 5'- GTTCGCTGTCTTGACCTTTTTGAT -3'

- COS264- Forward: 5'- GCGAAAGTCTCCGTCGAG -3'
- COS264- Reverz: 5'- TCCGTCTCTTCTTTGAGTCTCTTT -3'
- COS420- Forward: 5'- GCGCGAACTACTCGCTAAAC -3'
- COS420- Reverz: 5'- GATCTCATCTTCTGTGAAGTCCAA -3'
- COS424- Forward: 5'- CACATGCAGAAAATTCTTTCAAAC -3'
- COS424- Reverz: 5'- TGAATCATCGTATTTGAGAGTTGTG -3'

PCR összetevők:

A reakciók során DreamTaq (Thermo Scientific™) és GoTaq Flexi (Promega™) Taq polimeráz enzimet használtunk. A DNS minták koncentrációját 20 ng/μl-re állítottuk be. A PCR minták térfogata 10 μl (2 μl DNS + 8 μl mastermix) volt.

A DreamTaq polimeráz használatakor az alábbiak voltak a mastermix összetevői: 5x puffer: 2 μl, 25 mM MgCl₂: 0,5 μl, 2 mM dNTP: 0,3 μl, 10 μM reverse primer: 0,75 μl, 10 μM forward primer: 0,75 μl, 5 μg/μl Taq polimeráz: 0,05 μl, desztillált víz: 3,65 μl. A GoTaq Flexi polimeráz esetén a mastermix összetevői a következők voltak: 5x puffer: 2 μl, 10 mM dNTP: 0,2 μl, 10 μM reverse primer: 0,75 μl, 10 μM forward primer: 0,75 μl, 5 μg/μl Taq polimeráz: 0,05 μl, desztillált víz: 4,25 μl.

A Touchdown PCR beállításai a következők voltak: Hot start 3 perc 95 °C denaturálás 1x; 30 másodperc 95 °C denaturálás, 30 másodperc primer tapadás ciklusonként 1 °C-al csökkentve, 1 perc 72 °C szintézis 10x; 30 másodperc 95 °C denaturálás, 30 másodperc primer tapadás, 1 perc 72 °C szintézis 20x; 5 perc 72 °C utószintézis. A PCR gép ezután szintén 4 °C-ra hűti a mintát amíg ki nem kapcsoljuk. A különböző primereknél az tapadási hőmérsékletek az alábbiak szerint változtak:

- BolCRTISO: 70→61 °C
- Bra-OR: 65→56 °C
- COS015: 61→52 °C
- COS264: 64→55 °C
- COS420: 63→54 °C
- COS424: 61→52 °C

4.4.3 Agaróz gélelektroforézis:

A PCR során felszaporított fragmentumok vizuális detektálásához 1 vagy 3%-os agaróz gélt és etídium-bromid interkalálódó festéket használtunk. Molekulatömeg markerként GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder-t (Thermo Fisher) szolgált.

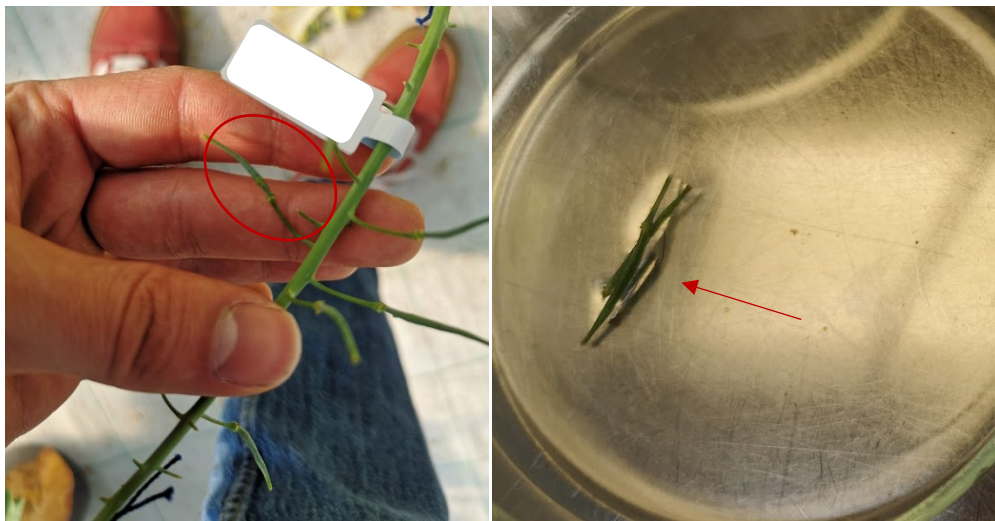
A gél töménységétől függően 0,8-2.4 g agarózport 80 ml 0,5x TBE pufferrel kevertük össze, majd addig melegítettük, amíg az agaróz fel nem oldódott teljesen. Ezek után folyó vízzel, folyamatos keveréssel 40 °C-ra visszahűtöttük, majd etídium-bromidot pipettáztunk bele. A fésűt, amely kialakítja a zsebeket, amikbe később a mintáinkat fogjuk belepipettázni, a gél szélével párhuzamosan, kb. 1 cm távolságra helyezük a még folyékony gélbe. Megvártuk míg kihűlt és megszilárdult, majd a futtatókádba helyeztük a gélt. Az elektroforetikus eljárás 90 V-on 40 percig tartott a 0,5x TBE pufferben.

Dokumentálásra Uvitech Cambridge Essential V6 géldoc rendszert használtunk, mely egy elzárt fülkében UV megvilágítással gerjeszti a fragmentumokban interkalálódott festéket és fényképet készít a gélről.

5. Eredmények és értékelésük

5.1 Embriómentés

Az embriómentést 2021 december 28.-tól kezdve 13 héten keresztül végeztük. Ezen időszak alatt 22 növényt regeneráltunk sikeresen, ebből 14 az O2 öntermékenyítésből származott. Először a becők esetén rövid idő, 6-8 DAP után végeztünk embriómentést. A becők ennyi idő elteltével még aprók 3.5 cm-re nőttek csak meg (7. ábra).



7. ábra: Fiatal becők a növényről begyűjtés előtt és után.

Felületükön kidudorodások nem voltak megfigyelhetőek. A bennük található magkezdemények fejletlenek voltak, a már abortált magkezdemények szintén megfigyelhetőek voltak bennük (8. ábra). Ezekből a becőkből származó magkezdemények esetén az O42 02. 15. keresztezés során sikerült növényt regenerálni. A becők könnyen felnyíltak, fontos volt az óvatos vágás annak érdekében, hogy az esetleg még nem abortált embriókat tartalmazó magkezdeményeket ne sértsük meg.



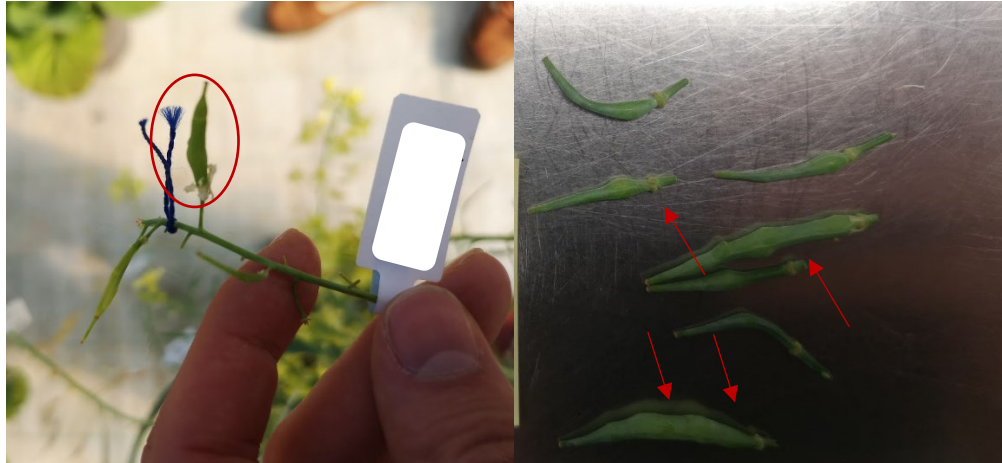
8. ábra: Fiatal becő (7 DAP) és a benne lévő abortált magkerdemények

A fejletlen magkezdemények áttetszők vagy enyhén zöldes színűek voltak, táptalajra helyezés után néhány nap alatt bebarnultak, majd a legtöbb esetben elpusztultak. Az ilyen korai fázisban izolált fejletlen becőből származó magkezdeményünknek 69 napra volt szüksége a csírázáshoz (9. ábra). A magkezdemények apró méretük mellett, rendkívül sérülékenynek bizonyultak, így az embriómentés nagyon nehezen volt megvalósítható. Ennek következtében arra jutottunk, hogy nem érdemes ilyen korai 6-8 DAP elteltével elvégezni a műveletet, annak ellenére, hogy minél több idő telik el a keresztezés után, annál nagyobb eséllyel abortálódnak az embriók.



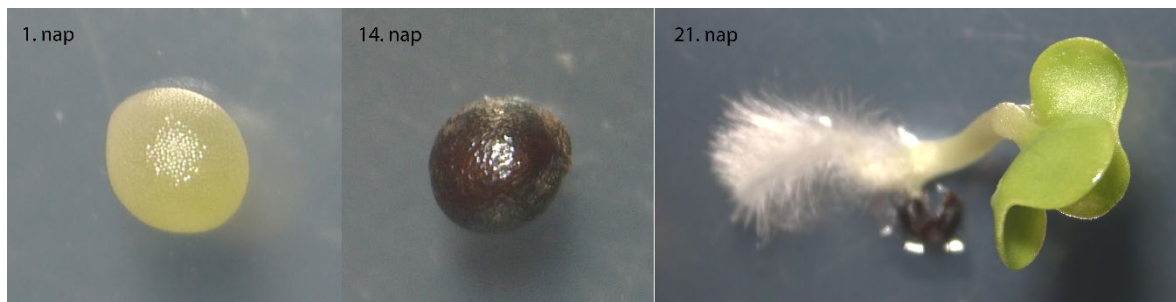
9. ábra: Fejletlen magkezdemény fejlődése és csírázása az idő múlásával (O42 02.15.)

A továbbiakban 14 DAP-on hajtottuk végre az embriómentést. Ennyi idő elteltével a becők mérete jelentősen megnövekedett, némelyiken vastag dudor jött létre. Az ilyen dudorok jelenléte legtöbbször érettebb magkezdeményekre utalt, amelyeket később nagyobb sikerrel tudtunk felnevelni (10. ábra).



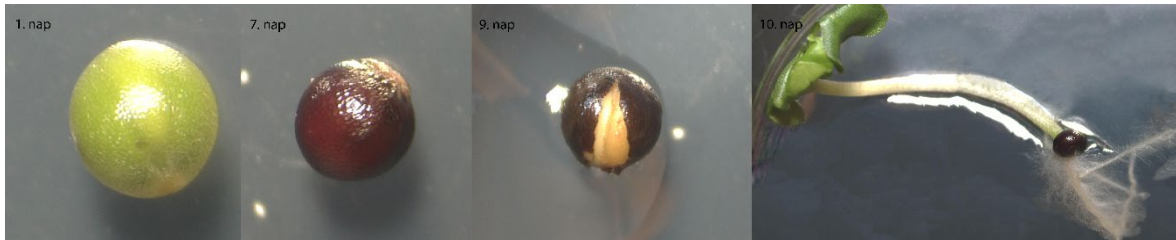
10. ábra: Becők és a rajtuk látható kidudorodások a 14 DAP-on

Az érettebb magkezdemények gömbölyűek, turgidak és lényegesebben nagyobbak voltak az éretlen társaikhoz képest. Felületük keményebb volt, preparálás közben nem sérültek könnyen. A táptalajra helyezést követően a felszínük hamar befeketedett, 3-7 nap alatt csíráztak (11. ábra).



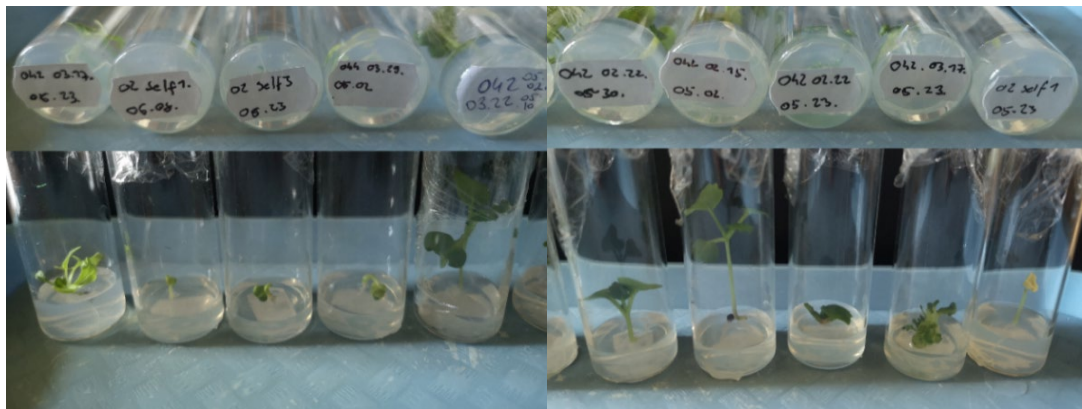
11. ábra: Érettebb magkezdemény növekedése és csírázása az idő múlásával (O44 03. 29.)

A kontroll öntermékenyítésből származó becők (O2 self.) a fejlettekhez hasonlóan nagy méretű, kitüremkedő becőkkel rendelkeztek. A kidudorodásoknál a becő rendkívül kemény volt, szintén óvatos mozdulatokra volt szükség, hogy ne sértsük meg a becőben megbúvó magkezdeményeket. A belőlük izolált szinte már magszerű zöld magkezdemények 1-2 nap alatt be barnultak és könnyen csíráztak (12. ábra). A legtöbb magkezdemény sikeresen csírázott, bizonyítva, hogy az embrióregeneráló táptalaj működik, összetétele optimális az általunk használt *Brassica* fajok embriómentéséhez.

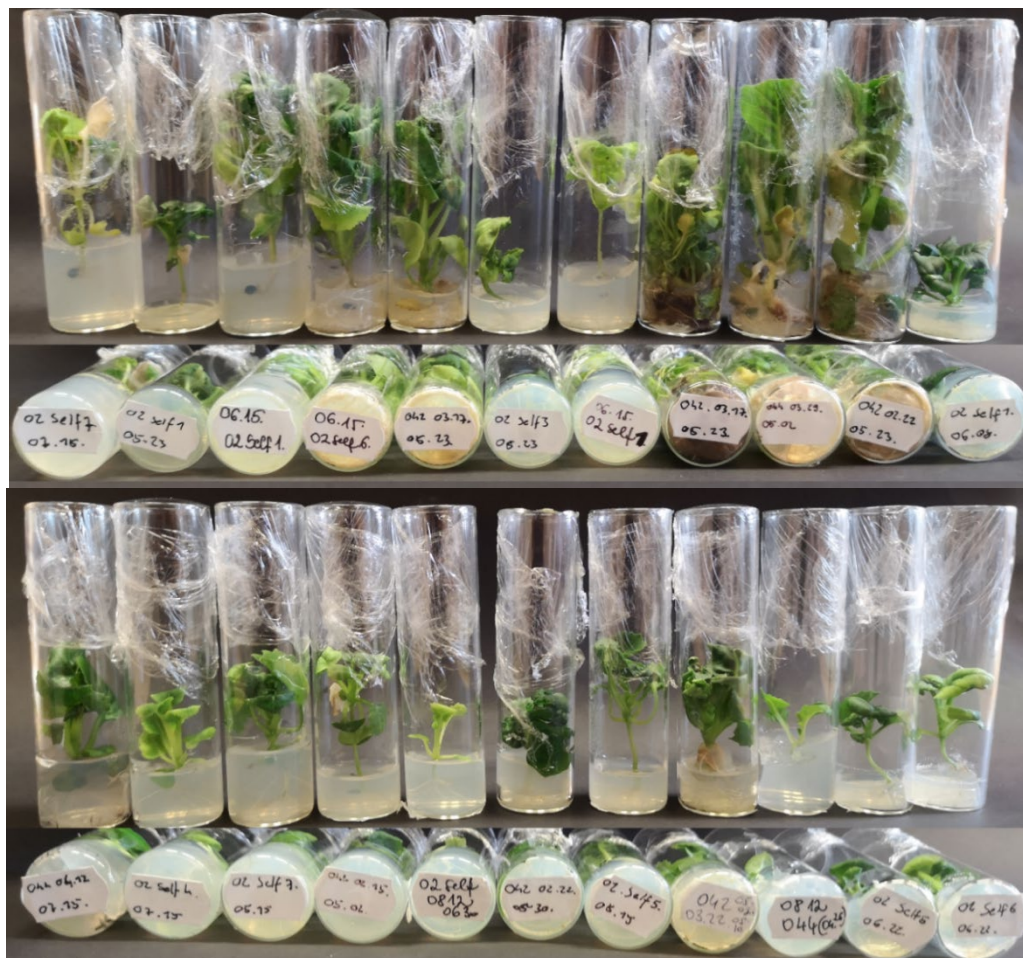


12. ábra: Kontroll (O2 self.) keresztezésből származó embrió növekedése és csírázása (O2 Self).

A csírázást követően a növényeket fiolákba kitöltött MS táptalajra helyeztük. Néhány nap alatt gyökerezésnek indultak, a kifejlődő levelek már ebben a korai stádiumban is komoly diverzitást mutattak, amely valószínűleg a kevert genomjuknak köszönhető, ami az idő múltával egyre egyértelműbbé vált (13., 14. ábra). Amint a növények elérték a fiolák tetejét, áthelyeztük őket befőttesüvegekbe.



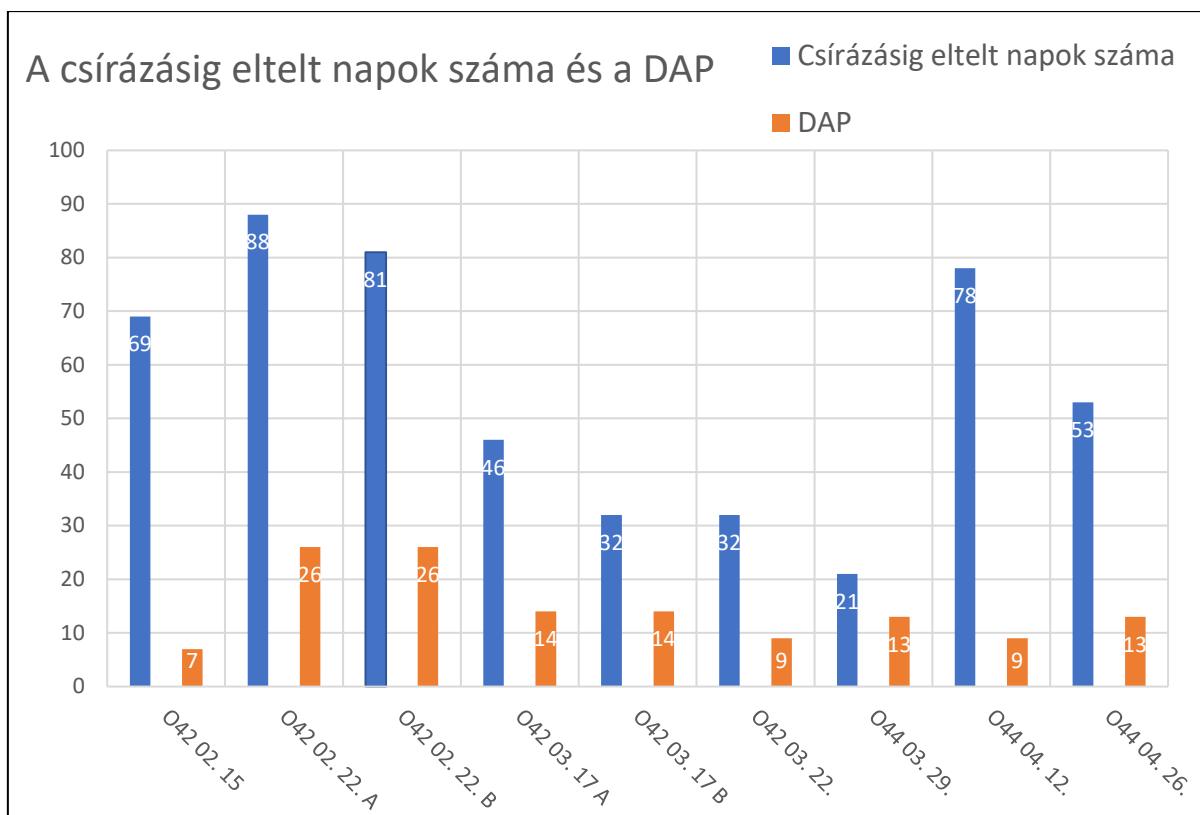
13. ábra: A kicsírázott növények a fiolákban (2022 június 8.)



14. ábra: A kicsírázott növények a fiolákban (2022. szeptember 15.)

Összesen hat O42 és három O44 keresztezésből származó magkezdemény csírázott ki, emellett 13 O2 Self növényt regeneráltunk. A 15. ábrán látható a regenerált magkezdemények csírázásáig eltelt napok száma és a DAP. Az csírázási idők hasonlóan alakultak a korábbi kísérletekhez, a leggyorsabban növekedésnek induló növénynek (O44 03. 29) 21 napra volt szüksége, csak úgy, mint az előző kísérletben, ahol az O7 hibridek átlagosan 26 nappal a táptalajra helyezés után csíráztak (Pongrácz 2021). Jól láthatóan négy növény (O42 02. 15., O42 02. 22. A, O42 02. 22. B, O44 04. 12.) 69-88 nap között csírázott, ami nem meglepő, ugyanis korábban az egyik hibridünk (O2) 126 nap elteltével hajtott ki (Pongrácz 2021). Az öntermékenyített növények (O2 Self) átlagosan 37 nap alatt csíráztak, (a leggyorsabb 7, a leglassabb 91 nap). Az eredményekben magas a variancia, ez annak köszönhető, hogy változatos genotípussal rendelkeznek. Összességében, a kéthetente új táptalajra helyezés során a befertőzések - ami a kísérlet számára a legnagyobb veszélyforrást jelenti - száma minimális volt. Sajnos a korábbi vizsgálatokhoz nem tudjuk hasonlítani az új táptalajra helyezés eredményességét, mert nem rögzítettük a mentett

magkezdemények számát, ennek ellenére munkánk sikeres volt, mert csak két keresztezésből (O42, O44) regenerálunk 9 db egyedet, korábban 4 sikeres keresztezésből (O2, O5, O7, O8) 12 db növény lett (Pongrácz 2021).



15. ábra: Az O42 és O44 keresztezésekből származó magkezdemények táptalajra helyezésétől, a csírázásig eltelt napok száma és a DAP.

5.2 Kromoszómafestés eredményei

A kariotipizálás a regenerált és a Bridge növények esetén nélkülözhetetlen, mert enélkül nem tudjuk felmérni, hogy a növényeink milyen kromoszómakészlettel rendelkeznek. A nemesítés szempontjából tudnunk kell, hogy a növény tartalmazza-e a számunkra fontos C genomot és a gazdaságilag jelentős narancssárga színért felelős gént. Flow citometriai vizsgálatokkal nem sikerült pontos kromoszómaszámot meghatározni, így más módszerekhez kellett folyamodnunk (Pongrácz 2021). A káposztafélékben egyszerű gyors festési eljárást nem találtunk, ezért az *Allium cepa* gyökércsúcs merisztéma festési protokolljához fordultunk.

A gyökereket *In vitro* mikroszaporított O5 keresztezésből származó gyökereken végeztük. A táptalaj nagy részének eltávolítása után csipesz segítségével óvatosan 1-3 cm

hosszúságú gyökércsúcsokat Eppendorf csőbe helyeztük, majd vízzel leöblítettük a maradék táptalaj darabokat. A tárolást csapvízben folytattuk, hogy a gyökércsúcsokat kisebb ozmotikus stressz érje. A gyökérmennyiség növelésére és a szilárd táptalaj okozta nehézségek kiküszöbölése érdekében megpróbálkoztunk a növények vízben történő nevelésére. A technika lényege az volt, hogy a táptalajból kivett növényeken hagytunk néhány gyökeret, majd fóliával lefedett, vízzel feltöltött befőttesüvegekbe helyeztük és lefedtük a növényeket. A lefedésre azért volt szükség, mert az *in vitro* nevelt növények a zárt térben felhalmozódó magas pártartalom miatt megnövekedett számú sztómával rendelkeznek, szabad levegőn azonban a fokozott transpiráció következtében hamar kiszáradnának. Az így nevelt növények nagy számú gyökeret növesztettek, azonban a tápanyaghiány következtében hosszú távon nem tudtuk életben tartani őket (16. ábra). A vízben nevelt és a táptalajban nevelt növények gyökeréből készült minták minősége között semmiféle különbséget nem tapasztaltunk.

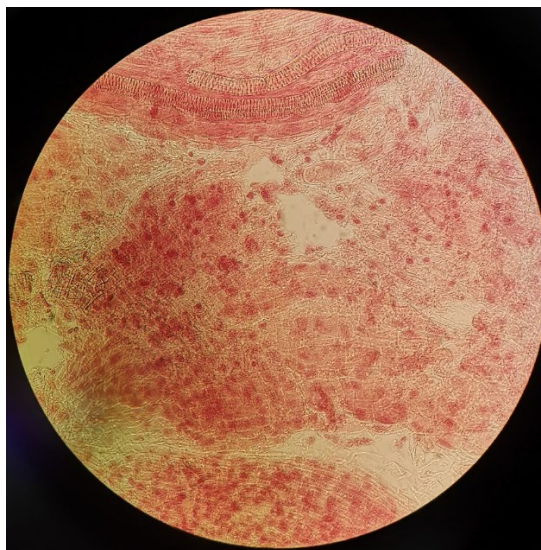


16. ábra: A vízben nevelt növény gyökérfejlődése

Első kísérletsorozatban az alábbi protokoll alapján dolgoztunk:

1. 30 perc Fixálás
2. Egy éjszakán át történő festés

A minta nem terült szét szépen, a sejtek jó része szétesett, a minta nehezen volt értékelhető a sok zavaró tényező miatt (sejtfal darabok, szennyeződések, erőteljesen festődött citoplazma) (17. ábra).



17. ábra: Első kísérletből származó minta (40X nagyítás)

Nyilvánvalóvá vált, hogy további kezelésekre van szükség a tisztább kép kialakításához. A következő kísérletben az alábbi protokoll alapján dolgoztunk:

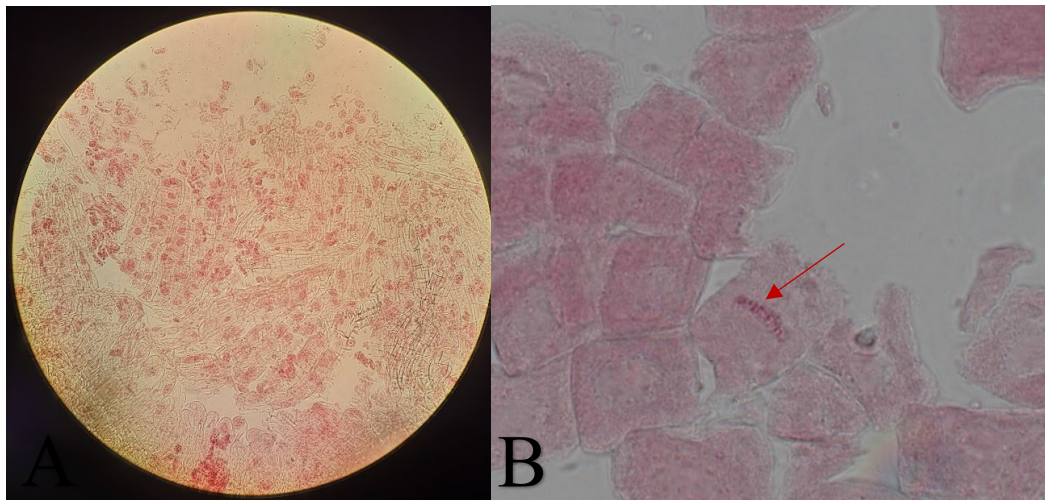
1. 10 perc Fixálás
2. 5 perc Macerálás
3. 2 perc desztillált vízzel öblítés
4. 3 perc Chamberlain oldat
5. 3 perc Posztfixálás
6. 10 perc festés

Az így festett minták már jobb eredményt mutattak, ennek ellenére arra jutottunk, hogy a *Brassica* gyökerei kisebbek és sérülékenyebbek voltak az *Allium* gyökércsúcsaihoz képest, ezért megpróbáltunk kevesebb behatással, rövidebb ideig elvégezni a kezeléseket. Azt reméltük, hogy így csökkenthetjük a behatást és kevesebb károsodást okozunk a sejtekben amellet, hogy a kezelések jótékony hatását megőrizzük. Emellet a festés idejét is megnöveltük, hogy erőteljesebb színezést kapjunk. A festék az összetevőiből adódóan szintén bír fixáló hatással. Az előzőekben megfelelően működő protokollt eszerint módosítottuk:

1. 5 perc Fixálás
2. 5 perc Macerálás
3. 2 alkalommal desztillált vizes öblítés

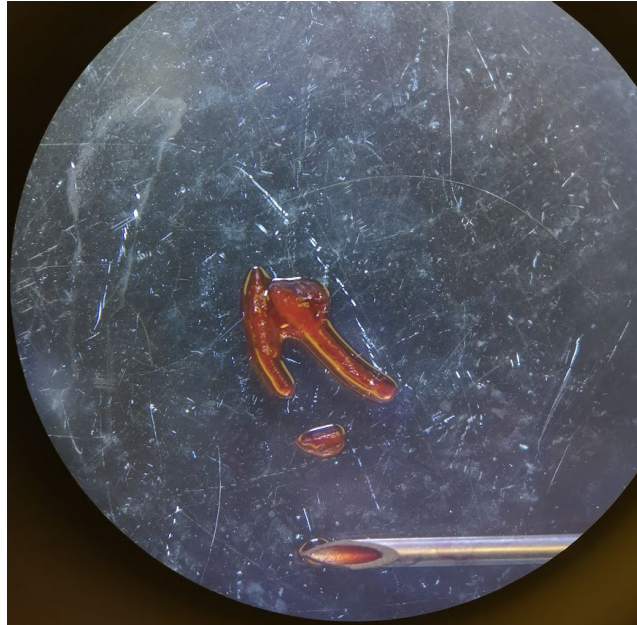
4. 3 perc Chamberlain oldat
5. 10 perc festés

A harmadik típusú protokoll kiváló eredményeket hozott. A merisztéma egyértelműen felismerhetővé vált, 1 sejtréteg vastagságúra szétnyomható lett a minta (18 A. ábra). A sejtek nagyrészt téglalap alakúak voltak, a teljes citoplazma színeződött, ennek ellenére a kromoszómák egyértelműen elkülönültek, erőteljesen festődtek. A sejtek között nem volt megtalálható a kármin darabok zavaró jelenléte (18 B. ábra).



18. ábra: A második típusú festés (A) 40X nagyításon és a harmadik típusú festés (B) 100X nagyításon, egy metafázisos sejt nyíllal jelölve

A tárgylemezre cseppenthetünk jégecet, vagy kárminecetsavat is, mindkét módszert kipróbáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a megfelelően szűrt kárminecetsav nem okozott felesleges festődést a sejtek között, így a továbbiakban ezt használtuk. A tüvel óvatosan levágtuk a gyökércsúcsok végét és ezeket az 1mm-nél kisebb darabokat óvatosan a tárgylemezre cseppentett kárminecetsavba helyeztük (19. ábra). A gyökércsúcsok az apró méretük következtében hamar kiszáradtak, így kulcsfontosságú volt a gyors és pontos munka a festékből való kivétel és a tárgylemezre helyezés között.



19. ábra: Gyökércsúcsok a festés után, alattuk egy már levágott darab. A tű külső átmérője 0.55 mm (10X nagyítás)

A fedőlemezeket először kanadabalzsammal próbáltuk lezárni, amely viszonylag jó hatással bírt, azonban néhány nap múltával száradni kezdtek a minták, ellehetetlenítve a későbbi mikroszkópos vizsgálatot. Később körömlakkal próbálkoztunk, amely egyszerűbben felvihető és gyorsabban szárad, mint a kanadabalzsam, de a minták még hamarabb száradásnak indultak. Ennek következtében a mintákat szükségszerű volt frissen elkészíteni és ezt követően a lehető leghamarabb vizsgálni és dokumentálni.

A működő protokoll kidolgozása után a sejtek szinkronizálása vált szükségessé, annak érdekében, hogy a lehető legtöbb sejt a fixálás ideje alatt a sejtosztódás valamelyik fázisában legyen, hisz a sejtmagi DNS csak ebben az időszakban veszi fel a kromoszómális elrendeződést. 8 órás jeges vízben és 4 °C-os hűtőben tárolás elegendőnek bizonyult a sejtekben zajló folyamatok lelassítására. Ezután a szobahőmérsékletre felmelegített gyökércsúcsokban újraindulhattak a merisztémasejtek osztódási folyamatai.

Az első kísérletsorozatban 14 minta készült, amelyeket a jeges vízből kivéve 7 óra szobahőmérsékletű tárolást követően fél óránként tettük fixálóba és kezdtük el a festési protokollt. Így vizsgálva, hogy a merisztémasejteknek mennyi időre van szükségük, míg elindul bennük a sejtosztódási ciklus. A vizsgálat alapján arra jutottunk, hogy a 7-9 órás időszak között kell keresnünk az optimális szinkronizálási időt. A második sorozatban ebben a 7-9 órás szakaszban 15 perces intervallumban végeztük el a festési eljárást. A 8:45 és a 9

órák mintákban jelentősen megnövekedett az osztódási fázisban lévő sejtek száma, egyszóval kimondhatjuk, hogy a szinkronizálási idő ebben az intervallumban található. Ennek eredményeképp sikerült találnunk egy sejtet, melyben a kromoszómák pontosabban felismerhetők (20., 21. ábra).



20. ábra: Szinkronizált minta több metafázisban lévő sejtrel és középen a számolásra alkalmas állapotban lévő sejt (40X nagyítás)



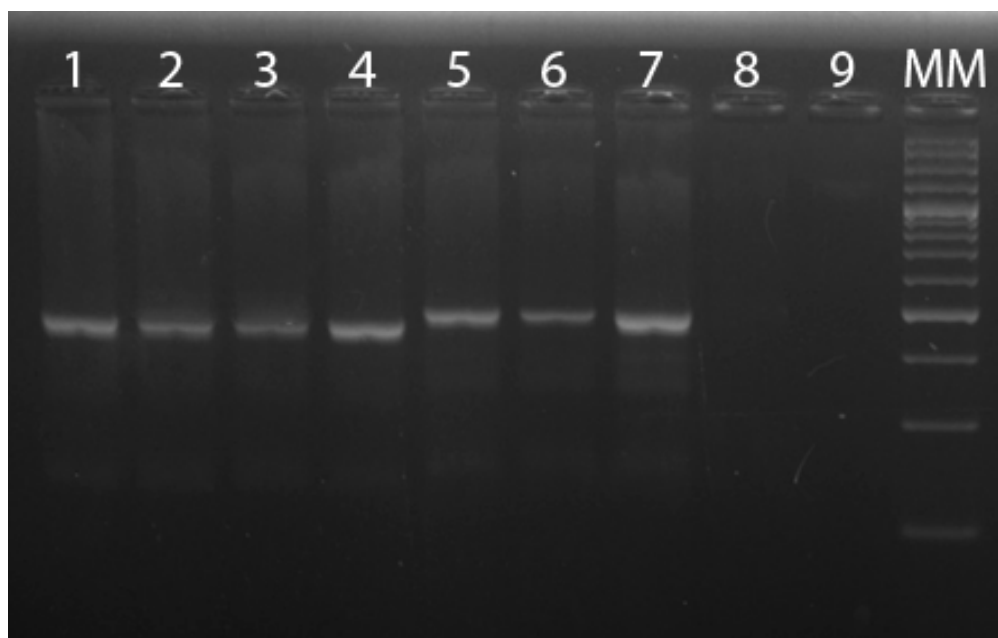
21. ábra: A kromoszómákról készült legjobb minőségű kép (100X nagyítás)

Próbálkoztunk konfokális mikroszkóppal is felvételt rögzíteni, azonban a kép homályos lett, nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. A látszat ellenére a minta pontos, minden kétséget kizáró kromoszómaszám meghatározásra nem alkalmas, de egy stabil alapot biztosít a további vizsgálatokhoz. A kromoszómák nem egyértelműen elhatárolhatók egymástól, átfedésben lehetnek. Az, hogy bizonyító erejű kromoszómaszám meghatározást lehetővé tevő technika fejlesztése meghaladta volna a diplomamunka technikai kereteit és időkorlátját.

5.3 PCR vizsgálatok eredménye

Bra-OR primerpár

A Bra-OR primerpár a kínai kel narancssárga mutáns CRTISO1 gén jelenlétében ad terméket, amelyet kb. 480 bp méretűnek várunk. A normál kínai kel esetében nem várható ampikon, hasonlóképpen a *B. oleracea* mintákban sem kapunk terméket. A vizsgált két O42-es és két O44-es növényekben, valamint az F1 hibridekben megkaptuk a várt PCR terméket, aminek a hossza szemmel láthatóan nem egyezik. Ennek okai lehetnek a 3%-os gél, illetve a futási körülmények. A vizsgált O42 és O44 növényekről megállapítható, hogy tartalmazzák a gazdaságilag jelentős narancssárga színért felelős gént, így a továbbiakban a nemesítési alapanyagként alkalmazhatóak (22. ábra).



22. ábra: 3%-os agarózgél EtBr-al festve, Bra-OR primerpár Touchdown 70 °C mintasorrend: 1 O42 02.22., 2 O42 03. 17., 3 O44 03. 24., 4 O44 04. 12., 5 F2-3, 6 F2-2., 7 narancssárga Kínai kel, 8 káposzta, 9 non templát. MM: GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder.

Bol-CRTISO1 primerpár

A Bol-CRTISO1 primerpár használatakor a *B. oleracea* faj genomjára jellemző karotinoid izomeráz gén jelenlétekor tapasztalhatunk egy 197 bp méretű fragmentumot. Ennél a primernél a *B. rapa* mintákban nem várunk PCR terméket. Az eredmények az elvárásaink szerint alakultak. Mind a regenerált növények, mind az F1 hibridek esetén szaporodott fel fragmentum jelezvén, hogy a növények tartalmazzák a *B. oleracea* genomot (23. ábra). A narancs Kínai kel negatív kontroll esetén nem szaporodott fel DNS szakasz. Az O44 minták esetén intenzívebb fragmentum jelenléte a DNS koncentráció vagy az izolátum tisztaságára vezethető vissza.



23. ábra: 3%-os agarózgél EtBr-al festve, Bol CRTISO1 primerpár Touchdown 70 °C mintasorrend: 1 O42 02.22., 2 O42 03. 17., 3 O44 03. 24., 4 O44 04. 12., 5 F1-1, 6 F1-2., 7 narancssárga Kínai kel, 8 káposzta, 9 non templát. MM: GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder

COS primerpárok

A COS primerpárok használatakor az A és a C genom kromoszómáinak jelenlétekor különböző fragmentum méretek amplifikálódnak. Ezek segítségével bizonyítható a növény hibrid mivolta. Minél több primert használunk, annál pontosabban meghatározható, hogy a regenerált növényeink és az ismeretlen eredetű Bridge növények milyen genomösszetétellel rendelkeznek. A COS242 primerpár előzőlegesen sikeresen tesztelve lett (Pongrácz 2021),

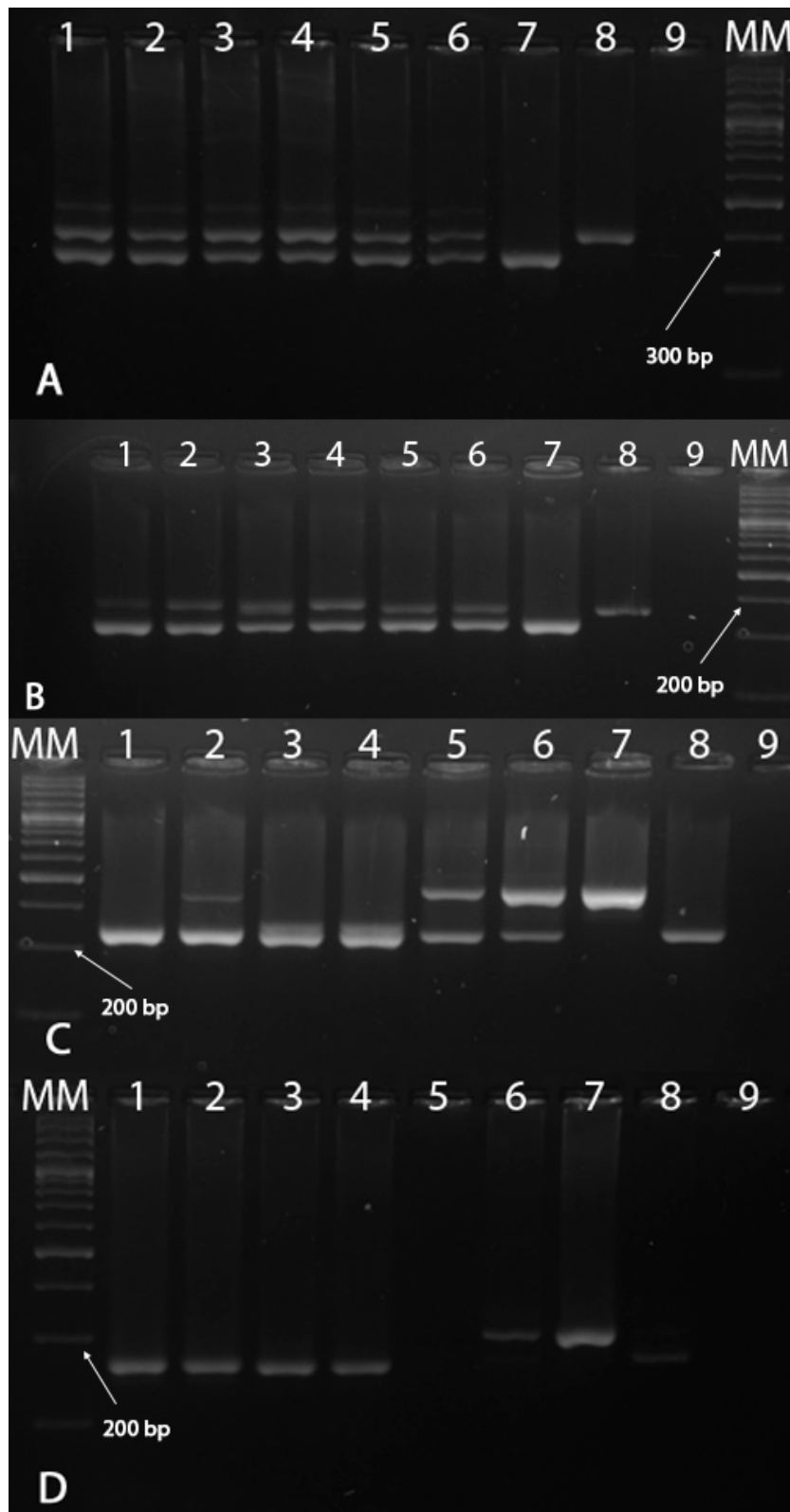
a következőkben újabb primerpárokat vontunk be, hogy beépíthetőek-e a nemesítés további lépéseibe.

A COS015 primerpár az elvárásoknak megfelelően különböző méretű fragmentumokat amplifikált a *B. rapa* (AA) és a *B. oleracea* (CC) kontroll minták esetén. A gélkép alapján megállapítható, hogy mind az O42, O44 növények, mind az F1 növények mindkét faj genomjára jellemző fragmenthosszt produkáltak (24 A. ábra). Célunk, hogy a *B. rapa* kromoszómái eliminálódjanak a későbbi visszakereszteзések során, a mutációt hordozó kromoszóma régió viszont interkalálódjon (pl. transzlokációval) a *B. oleracea* kromoszómáinak valamelyikébe. Ez jelen állapotban még nem történt meg. Megfigyelhető a növényeink mintáiban egy hosszabb halvány fragmentum, ami a nem specifikus primertapadás eredménye lehet.

A COS264 primerpár is az elvárt eredményt hozta, a növényeink tartalmazzák mindkét kromoszómát (24 B. ábra). A primerpár alkalmas további vizsgálatokra.

A COS 420 primerpár érdekes eredményeket hozott (20 C. ábra). Az O42 02.22. és az O44 növények már csak a C kromoszómára jellemző fragmentumot mutatják, amelyre a primerpár tapad, az O42 03. 17.-nél még megjelent az AA genom specifikus fragmentum is. Az F1 hibrid növények mindkét fragmenthosszt amplifikáltak bizonyítva a primerpár megfelelő működését.

A COS424 primerpár esetén az eredményeket nem tudjuk értékelni, mert az F1 esetén nem a várt eredményt, azaz a két fragmentumot kaptuk. A regenerált növények és az F1-2 csak a *B. oleracea* (CC) genom specifikus (rövidebb) fragmentet amplifikáltak, azonban az F1-1-nél nem szaporodott fel egyik genomra specifikus fragmentum sem (20 D. ábra). A kontroll minták és a regenerált növényekben felszaporodott fragmentumok különböző hosszúságúak, ennek következtében az eredményt nem tekintettük valósnak.



24. ábra: 3%-os agarózgél EtBr-al festve, COS015 (A), COS264 (B), COS420 (C), COS424 (D). Touchdown protokoll, mintasorrend: 1 O42 02.22., 2 O42 03. 17., 3 O44 03. 24., 4 O44 04. 12., 5 F1-1, 6 F1-2., 7 narancssárga Kínai kel, 8 káposzta, 9 non templát. MM: GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder

6. Következtetések és javaslatok

Munkánk célja az volt, hogy a távoli keresztezésekből (*B. oleracea* x *B. rapa*) származó becőkből sikeresen hajtsunk végre embriók- illetve éretlen magkezdemények mentését és felneveljük a növényeket. Arra jutottunk, hogy 14 DAP-nál korábban nem érdemes elvégezni az embriómentést, mert a magkezdemények ilyenkor még nem elég fejlettek, legtöbbjük nem csírázik. A 14 DAP után mentett növényekben fejlődő magkezdemények gömbölyűek, turgidak, táptalajra helyezés után napok alatt bebarnulnak és nagy arányban csíráznak. Az általunk használt szilárd Embryo-rescue táptalaj kiválóan alkalmasnak bizonyult, a további munkához a használatát javasolni tudom. Az ezt megelőző kísérletekhez képest újítás volt, hogy táptalajt cseréltünk két hét elteltével, ezzel biztosítva, hogy a magkezdemények mindig elegendő tápanyaghoz, emellett megfelelő hormon arányhoz és koncentrációhoz jussanak. A magkezdemények számának rögzítésével elemezni lehet a módszer sikerességét, továbbá a táptalaj csere növényregenerálódásra való hatását. Érdemes lehet a későbbiekben a keresztezés időpontja és a csírázáshoz szükséges idő közötti összefüggés vizsgálatát is elvégezni. Ehhez azonban több sikeresen regenerált növényre van szükség, hogy az eredmény statisztikailag értékelhető legyen. Az öntermékenyítésből származó becők kontrollként alkalmazhatóak a táptalaj kompatibilitásának tesztelésére, azonfelül kiválóan alkalmasak a preparálás módszerének megtanulásához, gyakorlásához, hogy a keresztezésből származó fontos becők esetében a magkezdeményeket azok megsértése nélkül, minél jobb arányban sikerüljön menteni. Annak érdekében, hogy az esetleges befertőzések alkalmával a lehető legkevesebb növényt veszítsük el, érdemes a táptalajokat minél kisebb méretű Petri csészébe kiönteni. A munkaigény megnövekedését kompenzálja a kisebb veszteség mellett az is, hogy így kevesebb táptalaj hulladék keletkezik, így növelve munkánk fenntarthatóságát és csökkentve a környezet terhelését.

A növények sikeres felnevelése mellett létfontosságú feladat a kromoszómaszám meghatározás annak érdekében, hogy definiálható legyen a sejtek kariotípusa. Ezáltal határozható meg a növény további nemesítésben való hasznossága. Munkánk során sikeresen adaptáltunk protokollt a káposztafélék gyökércsúcs merisztémájának festésére a kromoszómák vizsgálatához. A festéshez alkalmazott technika mellett, fél órás időintervallumra szűkítettük le a szinkronizáláshoz szükséges időt. További vizsgálatokban érdemes a szinkron időt Bridge növényekkel széleskörűbben kipróbálni, mert a kevert

kromoszómakészlet méretbeli különbségei miatt a sejtciklusok hossza változhat. Érdemes lenne fejlettebb, komplikáltabb, de jobb eredményt produkáló módszerekkel (pl.: FISH) próbálkozni, figyelembe véve a monokróm acetokármin festési technika korlátait. A vizsgálathoz szükséges gyökércsúcsok izolálása nehézkes feladat, próbálkoztunk a növények vízben tartásával. Érdemes lenne folyékony tápoldatokkal, vagy egyéb módszerekkel kísérletezni annak érdekében, hogy minél nagyobb méretű és mennyiségű gyökércsúcsot lehessen vizsgálni.

A PCR vizsgálatok során teszteltük a Bra-Or és BolCRTISO1 primereket melyekkel a vártnak megfelelő eredményt kaptuk, a további vizsgálatokban alkalmazását javaslom. A sárga kínai kelben felszaporodó halvány fragmentumot a Bra-OR primerpár esetén érdemes lehet szekvenálni annak érdekében, hogy kiderüljön mi a felelős a fragmentum megjelenéséért. A COS primerpárok segítségével érdemes tovább vizsgálni a növények genomösszetételét, továbbá még több primerpárt bevonni a kísérletbe annak érdekében, hogy pontosabb képet kaphassunk a növényekről. A primerek helyzetének meghatározása a genomban, kromoszómára lokalizálása érdekes kutatási cél lehet.

6. Összefoglalás

A β -karotin szervezetünk számára nélkülözhetetlen molekula, aminek egészségmegőrző szerepe bizonyított a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében, a nyálkahártya egészségének fenntartásában, a normál látás biztosításában, rendszeres fogyasztása csökkentheti a rák kialakulását. Ezért a magas karotintartalmú zöldségek fogyasztása az egészség megőrzésének szempontjából indokolt. A karfiolban bekövetkezett spontán mutáció következtében létrejött egy narancssárga változat, mely magas karotinoid tartalommal rendelkezik. Keresztezésekkel a gén introgresszálása a fejes káposztába kézenfekvő megoldásnak tűnt, de a növények nagyrészt a torzsában halmoztak fel karotint, a levelekben csak kisebb mértékben. A narancs kínai kelben található mutáns CRTISO1 gén alkalmas lehet az introgresszálásra, mert a belső levelekben halmoz fel karotint, a torzsában nem.

A keresztezéseket követően az O42, O44 és O2 self-ből származó becőkkel végeztük az embriomentést. Tapasztalataink szerint a 14 DAP (days after pollination) vagy annál később elvégzett embriómentések voltak sikeresek. Az ennél rövidebb idő után elvégzett mentésekből származó éretlen magkezdemények nagyon kis arányban csíráztak ki. Az öntermékenyítésből származó kontroll növények nagy arányban csíráztak bizonyítva, hogy az ER táptalaj megfelelően működik ezen hibrideknél. Összesen 22 növényt regeneráltunk, melyek már a korai fenofázisban rendkívül diverz küllemmel bírtak. A növényekből DNS izolálható, amivel a molekuláris vizsgálatokat tudjuk végezni. Kiültetve a következő évi keresztezések alapanyaga válhat belőlük, amennyiben tartalmazzák a számunka fontos narancssárga színért felelős gént. Amennyiben igen, a visszakereszteзések folytathatóak a Bridge növényekkel vagy fejeskáposztával.

A növények kariotípusának meghatározása elengedhetetlen annak érdekében, hogy következtetéseket tehesünk arra vonatkozóan, hogy milyen típusú genomot tartalmaznak. Ennek érdekében kromoszómafestési eljárást dolgoztunk ki. A megfelelő festési technika mellett, a szinkronizálás is létfontosságú. A kísérlet során sikeresen meghatároztuk a szinkronizáláshoz szükséges időt, így a továbbiakban a mikroszkópos vizsgálathoz megfelelő mennyiségű osztódásban lévő sejtet tudunk biztosítani. Sikeresen azonosítottunk egy sejtet, amelyben a kromoszómák jól láthatóak voltak, azonban egyértelműen nem volt meghatározható a kromoszómaszám, mert nem kizárható, hogy a képen látható kromoszómák egy része átfedésben van. A továbbiakban érdemes lenne egyéb (pl.: FISH),

kariotipizálásra alkalmas módszereket kipróbálni. A vizsgálathoz szükséges gyökércsúcsokat in vitro O5-ös növény tenyészetekből kivett és vízben nevelt növényekből nyertük. A továbbiakban a könnyebb, egyszerűbb munka és a nagyobb mennyiségű merisztémaszövet érdekében, érdemes lenne más módszereket fejleszteni a gyökércsúcsok számának és méretének növeléséhez.

PCR vizsgálatokat végeztünk a regenerált növényeken annak érdekében, hogy eldönthessük róluk, hogy részt vehetnek-e a nemesítés további lépéseiben. A reakció során O42 02.22., O42 03. 17., O44 03. 24., O44 04. 12., regenerált növényeket vizsgáltunk. Kontrollként narancssárga kínai kel és káposzta mellett, F1-1, F1-2., hibrid minták szolgáltak. Bra-Or primerpár segítségével vizsgáltuk, hogy a növényünk tartalmazza-e a keresztezések során introgresszálni kívánt narancssárga gént. BolCRTISO1 primert használtunk, ezzel a *B. oleracea* CRTISO1 génjének jelenlétét lehet ellenőrizni. A Bra-Or és BolCRTISO1 markerek segítségével sikeresen bizonyítottuk a gazdaságilag fontos gén jelenlétét a négy regenerált növényekben és a kontroll F1 hibridekben. A BolCRTISO1 primerpár segítségével sikeresen bizonyítottuk, hogy a növényeinkben a mutáns CRTISO1 gén heterozigóta formában van jelen. Továbbá Conserved Ortholog Set (COS) markerekkel elemeztük a felnevelt növények genomösszetételét. A COS primerek közül egy kivételével minden esetben az elvártaknak megfelelően megfigyelhető volt a hibrideknél az A és C genom specifikus fragmentum.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni konzulenseimnek, Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kittinek és Dr. Galli Zsoltnak, akik tudásukkal, idejükkel és szakértelmükkel támogatták munkámat. Ezen felül szeretném megköszönni Czinege Dórának, aki a keresztezéseket felügyelte és a kísérlethez szükséges növényanyagot biztosította, Dr. Polgári Dávidnak, aki a kromoszómafestés kidolgozásában és a mikroszkópos vizsgálat során nyújtott mérhetetlenül nagy segítséget, illetve a tanszék többi munkatársának, akik szükség esetén felügyelték a munkámat és akikhez kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam. Köszönöm Dr. Horváth Beatrixnek, aki a mikroszkópos vizsgálatnál, aki segített abban, hogy az eredményeimről jobb minőségű képek készüljenek, illetve Dr. Tóth Zoltánnak, hogy a laborjukban folytathattam az embriómentést az egyetemi labor felújítása alatt.

8. Irodalomjegyzék

1. Abdulkerim, E. Ibrahim, S. Rachel, E. Nathan, C. Torsten, B. (2022): Carotenoids and Their Health Benefits as Derived via Their Interactions with Gut Microbiota, *Advances in Nutrition*, 14 (2) 1-2.
2. Ben-Ari, G., Lavi, U. (2012): Marker-assisted selection in plant breeding. In: Altman, A., Hasegawa, P.M. (ed.): *Plant Biotechnology and Agriculture*. Elsevier, London, 586 p., 163-184.
3. Crisp, P., Walkey, D.G.A., Bellman, E. & Roberts, E. (1975): A mutation affecting curd colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* DC). *Euphytica*, 24 (1) 173–176.
4. Feng, H., Li, Y., Liu, Z., Liu, J. (2012): Mapping of or, a gene conferring orange color on the inner leaf of the Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Mol Breeding*, 29 (1) 235-236.
5. Fulton, T. M., Hoeven, R., Eanetta, N. T., Tanksley, S. D. (2002): Identification, Analysis, and Utilization of Conserved Ortholog Set Markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *Plant Cell*, 14 (7) 1457–1467.
6. Galli, Zs., Bedzsó, G., Heszky, L., Róth, F., Szóke, A., Kis, E. (2015): Development and use of molecular markers for two Gain-of-function colour gene mutations in cauliflower. *Hungarian Agricultural Research*, 24 (1) 25-32.
7. Jeong, Y. M., Chung, W. H., Chung, H., Kim, N., Park, B. S., Lim, K. B., Yu, H. J., Mun, J. H. (2014): Comparative analysis of the radish genome based on a conserved ortholog set (COS) of *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 127 (9): 1975-1989.
8. Kiss Gy., Endre G. (1999): Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. In.: Balázs E., Dudits D. (szerk.): *Molekuláris növénybiológia*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 706 p., 37-91p.
9. Lee, S., Lee, S., Byun, D. H., Lee, D. Y., Park, J. Y., Lee, J. H., Lee, H. O., SunG, S. H. & Yang, T. (2014): Association of molecular markers derived from the BrCRISTO1 gene with prolycopene-enriched orange-colored leaves in *Brassica rapa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 127 (1) 179-191.
10. Li, P., Zhang, S., Zhang, S., Li, F., Zhang, H., Liu, X., Wu, J., Wang, X., Sun, R. (2015): Carotenoid identification and molecular analysis of carotenoid isomerase-encoding BrCRTISO, the candidate gene for inner leaf orange coloration in Chinese cabbage. *Mol Breeding*, 35 (1) 2-3.
11. Lu, L.W., Gao, Y., Quek, S.-Y., Foster, M., Eason, C.T., Liu, M., Wang, M., Chen, J.-H. and Chen, F. (2022): The landscape of potential health benefits of carotenoids as natural supportive therapeutics in protecting against Coronavirus infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154 113625. 1-21.
12. Manton I. (1932): Introduction to the general cytology of the Cruciferae. *Annals of Botany*, 46(3) 509–556.
13. Manu, K., Ju-Young, C., Nisha, K., Ashwani, P., Seong-Ryong, K. (2015): Molecular breeding in *Brassica* for salt tolerance: importance of microsatellite (SSR) markers for molecular breeding in *Brassica*. *Frontiers in Plant Science*, 6(1) 1-13.
14. María, E. C., Fernando, C.-M., Sara, O., Francisco, R. B.-P., Antonio, D. H. (2021) Advances in Breeding in Vegetable *Brassica rapa* Crops. In: Aminul Islam, A. K. M. (ed.): *Brassica Breeding and Biotechnology*. IntechOpen. London, 174 p., 1-4.
15. Nagaharu U. (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 (1) 389-452.
16. Niyogi, K. (1999): Photoprotection revisited, *Annual review of plant biology*, 50 (1) 333-359.
17. Podsedek, A. (2007): Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 40 (1) 1-11.
18. Pongrácz E. (2021): A Kínai kel narancssárga mutációjának átvitele káposztafélékbe embriómentéssel. TDK dolgozat, MATE, Gödöllő, 50 p.
19. Rahman, M. H. (2004): Optimum age of siliques for rescue of hybrid embryos from crosses between *Brassica oleracea*, *B. rapa* and *B. carinata*. *Canadian Journal of Plant Science*, 84 (1) 965 – 969.

20. Ripa, R. S., Jyoti, S. D., Robin, A., H. K. (2020): Prospects of Embryo Rescue in Developing Novel Brassica Genotypes. *Plant Breed. Biotech.*, 11 (1) 1-14.
21. Sandmann, G. (2001): Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends in Plant Science*, 6 (1) 14-17.
22. Sax K. (1923): The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, 8(6) 552–560.
23. Schmidt-Dannert, C., Umeno, D., Arnold, F. (2000): Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.*, 18 (1) 750–753
24. Shan, L., Joyce, V.E., Xiangjun, Z., Alex, B.L., Diana, M.O., Kelly, M.C., Brian, J.C., Dominick, J.P., David, F.G., Julia, V., Leon, V.K., Hendrik, K., Elizabeth, D.E., Jun, C., Li, L. (2006): The Cauliflower Or Gene Encodes a DnaJ Cysteine-Rich Domain-Containing Protein That Mediates High Levels of b-Carotene Accumulation. *The Plant Cell*, 18 (12) 3594-3595.
25. Sharma, D.R., Kaur, R., Kumar, K. (1996): Embryo rescue in plants – a review. *Euphytica*, 89 (3) 369p.
26. Shilpa, S. Shwetha, H.J. Raju, M. Lakshminarayana, R. (2020): Factors affecting bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids Carotenoids. In: Charis M.G. (ed.) *Properties, Processing and Applications*, Elsevier, London 41-73.
27. Szűcs K. M. (2015): Kodomináns marker fejlesztése a kínai kel narancsszínű mutációjára és a mutáció átvitele Brassica oleracea-ba embryo rescue módszerrel. Diplomamunka, SZIE, Gödöllő, 49 p.
28. Tongbing, S., Shuacang, Y., Fenglan, Z. J. W. F., Yangyun, Y., Deshuang, Z., Xiuyun, Z., Weihong, W. (2015): Loss of Function of the Carotenoid Isomerase Gene BrCRTISO Confers Orange Color to the Inner Leaves of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (3) 648 – 659.
29. Watanabe, M., Musumi, K. & Ayugase, J. (2011): Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage. *LWT – Food Science and Technology*, 44(9) 1971-1975.
30. Zandberg, J.D., Fernandez, C.T., Danilevich, M.F., Thomas, W.J.W., Edwards, D., Batley, J. (2022): The Global Assessment of Oilseed Brassica Crop Species Yield, Yield Stability and the Underlying Genetics. *Plants*, 11(20) 2170.
31. Zhang, J., Li, H., Zhang, M., Hui, M., Wang, O., Li, L. & Zhang, L. (2013): Fine mapping and identification of candidate Br-or gene controlling orange head of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Molecular Breeding*, 32(4) 799-805.
32. Zhou, X., Sun, T., Wang, N., Ling, H., Lu, S., Li. (2010): The cauliflower Orange gene enhances petiole elongation by suppressing expression of eukaryotic release factor 1. *New Phytologist*, 190 (1) 89–100.
33. Zoshuk, N.V., Badaeva, E.D., Zelenin, A.V. (2002): History of Modern Chromosomal Analysis Differential Staining of Plant Chromosomes. *Russian Journal of Developmental Biology*, 34 (1) 1-13.
34. http 1 Higdon, J.: α -Carotene, β -Carotene, β -Cryptoxanthin, Lycopene, Lutein, and Zeaxanthin <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietaryfactors/phytochemicals/carotenoids#summary> (2023 március)
35. http 2 Fontosabb zöldségfélék termésmennyisége. https://www.ksh.hu/stadat_files/mez/hu/-mez0016.html (2023 március)

9. Mellékletek

1. számú melléklet: 1. táblázat. A szilárd embrióregeneráló táptalaj komponensei

Komponensek	Összegképlet/név	Mennyiség(mg/l)
Makroelemek	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	134
	KNO_3	3000
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	750
Mezoelemek	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8
	Na-EDTA	37,3
Mikroelemek	H_3BO_3	3
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Vitaminok	tiamin HCl	10
	piridoxin HCl	1
	nikotinsav HCl	1
	myo-inozitol	100
Aminosavak	glutamin	800
	szerin	100
Fitohormonok	6-BAP	0,2
	IAA	0,2
Cukor		20g
Agar		8g
pH		5,8

2. számú melléklet: 2. táblázat. A szilárd MS táptalaj komponensei

Komponensek	Összegképlet/név	Mennyiség (mg/l)
Makroelemek	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	150
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
	KH ₂ PO ₄	170
Mezoelemek	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8
	Na-EDTA	37,3
Mikroelemek	H ₃ BO ₃	3
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
	KI	0,83
Vitaminok	tiamin HCl	1
	piridoxin HCl	0,5
	nikotinsav HCl	0,5
	myo-inozitol	100
Aminosavak	glicin	2
Cukor		30g
Agar		8g
pH		5,8

3. számú melléklet: 3. táblázat. Elvégzett keresztezések adatai

Keresztezés dátuma	Keresztezés sorszáma	ANYA plot	APA plot
2021.11.24	O21	F1	21W0248.1
2021.12.01	O20	F1	21W0258.1
	O23	F1	21W0331.1
	O28	F1	21W0231.1
2021.12.08	O23	F1	21W0331.1
	O28	F1	21W0231.1
2021.12.15	O31	F1	21W0061.2
2022.02.08	O39	F1	Bridge1
	O40	F1	Bridge2
2022.02.15	O39	F1	Bridge1
	O40	F1	Bridge2
	O42	O2	Bridge1
2022.02.22	O39	F1	Bridge1
	O40	F1	Bridge2
	O42	O2	Bridge1
2022.03.01	O39	F1	Bridge1
	O40	F1	Bridge2
	O42	O2	Bridge1
2022.03.08	O39	F1	Bridge1
	O40	F1	Bridge2
	O42	O2	Bridge1
2022.03.17	O40	F1	Bridge2
	O41	F1	Bridge3
	O42	O2	Bridge1
2022.03.22	O42	O2	Bridge1
2022.03.24	O43	O2	Bridge2
	O44	O2	Bridge3
	O45	O5(05.04)	Bridge1
2022.03.29	O40	F1	Bridge2
	O43	O2	Bridge2
	O44	O2	Bridge3
	O45	O5(05.04)	Bridge1
2022.04.05	O40	F1	Bridge2
	O41	F1	Bridge3

4. sz. függelék – Hallgatói és konzulensi nyilatkozat minta

NYILATKOZAT

Alulírott PANCE MIKLÓS ALMOS, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, SZENT ISTVÁN Campus, MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS szak nappali/levelező* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.
A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2023 év MÁJUS hó 03. nap

Pance Almos
Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: 2023 év MÁJUS hó 03 nap

Pál-László Albert
Belső konzulens

*Kérjük a megfelelőt aláhúzni!

A kínai kel narancssárga mutációjának átvitele káposztafélékbe embryo-rescue módszerrel

Pance Miklós Álmos

Mezőgazdasági biotechnológus mesterszak, növénybiotechnológia specializáció

Genetika és Biotechnológia Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kitti, egyetemi adjunktus, Genetika és Biotechnológia Intézet, Genetika és Genomika Tanszék

Dr. Galli Zsolt, Czinege Dóra, növénynemesítő, Syngenta Kft.

A β -karotin szervezetünk számára nélkülözhetetlen molekula, aminek egészségmegőrző szerepe széles körben bizonyított, rendszeres fogyasztása csökkentheti a rák kialakulását. A narancs kínai kelben található mutáns CRTISO1 gén alkalmas lehet az introgresszálásra káposztafélékbe, mert a belső levelekben halmoz fel karotint.

A keresztezéseket követően az O42, O44 és O2 self-ből származó becőkkel végeztük az embriomentést. Tapasztalataink szerint a 14 DAP (days after pollination – beporzás utáni napok száma), vagy annál később elvégzett embriomentések voltak sikeresek. Összesen 22 növényt regeneráltunk, amelyek már a korai fenofázisban rendkívül diverz küllemmel bírtak. Kiültetve a következő évi keresztezések alapanyaga válhat belőlük, amennyiben tartalmazzák a számunkra fontos narancssárga színért felelős gént.

A növények kariotípusának vizsgálata elengedhetelen annak érdekében, hogy meg tudjuk határozni, hogy milyen típusú genomot tartalmaz. Ennek érdekében kromozómafestési eljárást dolgoztunk ki. A kísérlet során meghatároztunk a szinkronizáláshoz szükséges időt. Sikeresen azonosítottunk egy sejtet, amelyben a kromozómák jól láthatóak voltak, azonban egyértelműen nem volt meghatározható a kromozómaszám. A továbbiakban érdemes lenne egyéb (pl.: FISH), kariotipizálásra alkalmas módszereket kipróbálni.

PCR vizsgálatokat végeztünk a regenerált növényeken annak érdekében, hogy eldönthessük róluk, hogy részt vehetnek-e a nemesítés további lépéseiben. A reakciók során O42 02.22., O42 03. 17., O44 03. 24. és O44 04. 12. regenerált növényeket vizsgáltunk. A Bra-Or és BolCRTISO1 markerek segítségével sikeresen bizonyítottuk a gazdaságilag fontos gén jelenlétét a regenerált növényekben. Ennek a két primerpárnak az együttes elemzése lehetővé teszi, hogy kodomináns markerként használjuk a gén jelenlétének kimutatására. A COS markerek az A és C genom jelenlétében különböző méretű fragmentum felszaporodásával jelzik a növény genomösszetételét. A vizsgálat során sikeresen alkalmaztuk a COS015, COS264 és COS420 markereket, annak megállapítására, hogy A vagy C genommal rendelkeznek.