

DIPLOMADOLGOZAT

Palotai Csaba
Mezőgazdasági biotechnológus MSc

Gödöllő
2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Mezőgazdasági biotechnológus MSc

**Gyökérgubacs fonálféreg (*Meloidogyne spp.*) szembeni rezisztencia
genetikai hátterének kutatása paprikán (*Capsicum spp.*)**

Belső konzulens: Dr. Tóth Zoltán

Tudományos munkatárs

Tóth Máté

Phd hallgató

Készítette: Palotai Csaba

EW5B0X

nappali tagozat

Intézet/Tanszék: Genetika és Biotechnológia Intézet

Mikrobiológia és Alkalmazott

Biotechnológia Tanszék

Gödöllő

2023

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. Gyökérgubacs fonálféreg (<i>Meloidogyne spp.</i>)	4
2.2. <i>Capsicum annuum</i>	7
2.3. Rezisztencia gének	8
2.4. Molekuláris markerek.....	10
2.5. Genetikai transzformáció.....	15
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	18
3.1. A munka előzményei.....	18
3.2. Növényi minták feldolgozása	18
3.3. Szekvenciák molekuláris vizsgálata	19
3.4. A génjelöltek klónozása	21
3.5. Gateway klónozás	22
3.6. Génbevitel transzformációval.....	25
3.7. Növény transzformáció.....	26
3.8. Transzformáns növények detektálása.....	29
3.8.2. Fertőzés fonálféreggel, kandidáns gének fenotípusának kiértékelése	30
4. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSŰK	31
4.1. Génjelöltek.....	31
4.2. Oligók tervezése a klónozáshoz.....	32
4.3. A régió további szűkítése molekuláris módszerekkel	32
4.4. Klónozás.....	32
4.4.1. Génjelöltek amplifikációja és izolálása	32
4.4.2. BP reakció.....	33
4.4.3. LR reakció	35
4.5. Növény transzformáció.....	36
4.6. Expresszió kimutatása	37
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	42
6. ÖSSZEFOGLALÁS	44
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	44
8. IRODALOMJEGYZÉK	46
9. MELLÉKLETEK.....	51

1. Bevezetés és célkitűzések

A *Meloidogyne* fajok a világ egyik legkárosítóbb patogénjeiként vannak számontartva. Polifág kártevő révén megjelenhetnek zöldség-, gyümölcs-, és dísnövénytermesztésben is. Károsításuk azonban zöldség-hajtásban a legnagyobb, ugyanis trópusi kártevő lévén a hajtatási körülmények a legkedvezőbbek a gyökérgubacs-fonálféreg fajok számára. Jelenleg legtöbbit alkalmazott védekezési módszer ellene a kémiai védekezés, azonban a legtöbbit alkalmazott kémiai szer, a metil-bromid 2005-ben betiltásra került az Európai unióban. A felhasználható kémiai szerek, valamint a környezettudatos életmód terjedésének köszönhetően célszerű új, alternatív védekezési módok után kutatni. Ilyen alternatív megoldást kínálhatnak a rezisztencia gének, melyeket precíziós nemesítéssel, vagy egyes országokban génmódosítással juttatnak be a növényekbe.

A paprika tápértéke és gazdasági jelentősége révén a világ és Magyarország egyik legjelentősebb zöldségtermő növénye. Termesztése világszerte megközelíti a 40 millió tonnát. Hazánkban az egyik legnagyobb mennyiségben hajtattott zöldségnövény. A hajtattott paprika felülete eléri az 1500 ha-t, össztermésátlaga pedig 50 t/ha fölötti. Magyarország paprikafogyasztás szempontjából is kimagasló helyen áll a világon. Felmérések alapján az egyik legtöbbit vásárolt, és fogyasztott zöldségnövényünk a paprika. Ezen szempontok és a paprika hőigénye alapján, kiemelt fontosságú a paprika védelme a gyökérgubacs fonálféreggel szemben.

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézet Alkalmazott Növénygenomikai csoportja évek óta kutatja a gyökérgubacs fonálféreggel szembeni rezisztenciát biztosító *Mel* gént. Kutatásaik során azonosították a *Mel* gén kromoszómális helyzetét, majd térképezési módszerekkel egy ~70 kbp-os régióra szűkítették le a *Mel* régióját. A genomi régió paprika adatbázisok és bioinformatikai módszerek segítségével két gént azonosítottak. A diplomadolgozatomban a lehetséges génjelöltek szerepét igyekeztünk igazolni a gyökérgubacs fonálféreg elleni rezisztencia kialakításában.

Célkitűzéseink:

- A *Mel* génjelöltek izolálása és amplifikációja,
- Gateway módszer segítségével a génjelöltek expressziós vektorba juttatása,
- *Agrobacterium rhizogenes* közvetítette növény transzformáció,
- Génexpresszió kimutatása a transzformált növényeken,
- Transzformált növények gyökérgubacs fonálféreg fertőzése, és a lehetséges génjelöltek kiértékelése.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Gyökérgubacs fonálféreg (*Meloidogyne spp.*)

2.1.1. Általános jellemzés

A gyökérgubacs-fonálféreg a hengerfélék (*Nemathelminthes*) törzsébe, a fonálféreg (Nematoda) osztályába, *Tylenchida* rendbe, és a *Meloidogynidae* családba tartoznak. A *Meloidogynidae* családba a gyökérgubacs-fonálféreg (*Meloidogyne spp.*) mellett két másik nemzetséget sorolunk, a *Meloidodorella* és a *Meloinema* nemzetséget. A két utóbbi nemzetség fajai Európán kívül élnek (Farkas és Andrassy, 1988). A *Meloidogyne* nemzetségen belül eddig leírt fajok száma megközelíti a 100-at, ezek közül 23 fajt találtak és figyeltek meg Európán belül. A 23 faj közül négy fő fajt lehet kiemelni, a *M. arenaria*, *M. incognita* (1. ábra), *M. javanica* és a *M. hapla* melyek mezőgazdasági szempontból a legelterjedtebb és legfontosabb károsítói a haszonnövényeknek. Hazánkban a *M. incognita*, *M. arenaria* és a *M. javanica* előfordulása növényházakban jellemző, míg a *M. hapla* a szabadföldön figyelhető meg (Wesemael *et al.*, 2011).



1. ábra: *Meloidogyne incognita* fénymikroszkópos képe ([http1](#))

A kifejlett nőtény a tojásokat egy zselatinszerű anyagba burkolva rakja melyek így egy nagy tojástömeget alkotnak. A tojástömegek a gyökér felszínén, vagy egyes esetekben a gubacsokba, vagy a gyökérszövetbe ágyazva helyezkednek el, és akár 1000 tojást is tartalmazhatnak. A lárvák első vedlése még a tojáson belül lezajlik, így a tojásból már J2 juvenilis fázisban kelnek ki (Jones *et al.*, 2013). A *Meloidogyne* fajok összetett táplálkozási kapcsolatot alakítanak ki gazdanövényükkel, és speciális táplálkozási struktúrákat, úgynevezett

óriássejteket indukálnak, amelyek nélkülözhetetlenek a fonálféreg táplálkozásához és fejlődéséhez (Bird, 1961). A fertőzést a J2 stádiumú lárvák okozzák, melyek általában a gyökérsüveg közelében hatolnak be a gyökérzetbe. Ehhez a szájszuronyukkal fizikai sebzést, valamint különböző cellulitikus és pektolitikus enzimeket használnak. Ezután a lárva kialakítja az állandó étkezési helyét, ahol fehérjebontó enzimek hatására indol-vajsav keletkezik, aminek a gubacsok, valamint az óriássejtek létrejöttében van szerepe. Az így kialakult óriássejtek adják a lárva további fejlődéséhez szükséges tápanyagokat, melyet a szájszurony segítségével, szívogatva fogyaszt el. A J2 stádiumú féreg ezután még háromszor vedlik amíg eléri a kifejlett felnőtt stádiumot. Ezekben a fázisokban a lárva szuronya fejletlen, ennek okán a J3 és J4 fázisban nem táplálkozik, hanem az eddig felhalmozott tápanyagokból él és fejlődik. A hím egyedek fonál alakúak, és elhagyják a gyökeret, míg a nőtény az étkezi helyén marad, tovább növekszik, és körte alakot vesz fel (Jones *et al.*, 2013). A gyökérgubacs fonálféreg nem aránya kiegyensúlyozatlan. A szaporodási stratégiák kivételes változatosságát mutatják, az ivaros szaporodástól a szűznemzésig. A legtöbb faj partenogenetikus, és a hímek csak kedvezőtlen körülmények között jönnek létre. Fejlődésük 30-60 napig tart a gazdanövénytől és hőmérséklettől függően (Chitwood és Perry, 2009).

2.1.2. Fertőzése és védekezési módok

A *Meloidogyne* fajok polifág fitoparaziták, ebből adódóan igen széleskörben károsíthatnak. Megjelenhetnek zöldségféléken, gyümölcsökön, dísznövényeken, de akár gyomnövényeken is. Zöldségtermesztésben kártételük fűszer- és étkezési paprikán, uborkán, paradicsomon, valamint a gyökérsüvegféléken jelentős. (Mándoki és Fail, 2007). A gyökérgubacs-fonálféreg szúrásai által kibocsátott emésztőenzimek hatására a sejtfalak feloldódnak, óriássejtek képződnek, melyek gátolják a növény víz- és tápanyagszállítását, így a növények gyengén fejlődnek, ami kivételesen nagy károkat okoz abban az esetben, ha a növény már palánta korban megfertőződött (Bíró, 2016). A fertőzött növények levelei lankadnak, hervadni kezdenek, meleg időjárás során a vízhiány tüneteit mutatják, a virágok nehezen kötődnek és a termés hozamuk is jelentősen csökkenhet (Jenser *et al.*, 2003). A gazdanövény gyökerén borsószem, bors vagy egyes esetekben akár mogyoró nagyságú gubacsokat alkot. (2. ábra)



2. ábra: Gubacsok a gyökérszeten (<http2>)

A fertőzött növény gyökérszete feldúsul, és intenzív oldalgyökér-fejlődés figyelhető meg rajta (Andrássy és Farkas, 1988). A gyökérszedségfélék esetében a rajtuk keletkezett látványos kárkép jelentős mértékben rontja a piacképességüket, főleg a hajtatott és korai sárgarépa esetében. A paprikatermesztésben néhány hosszú tenyészidejű faj különösen érzékeny, ilyenkor a növények csúcsi részén vashiányos tünetekhez hasonló kivilágosodás figyelhető meg (Bíró, 2016). A hajtatott paprika szempontjából legveszélyesebb *M. incognita* kártétele szabadföldön nem haladja meg a 20 %-ot, növényházban viszont hőigényes növények esetében, (mint például a paprika) elérheti akár a 100 %-ot is. Ilyen mértékű károsításra abban az esetben kerülhet sor, ha az üvegházban éveken keresztül hőigényes fajok voltak termesztve, illetve, ha a talajfertőtlenítés elmaradt, vagy szakszerűtlenül lett elvégezve. Jelentős lehet a kártétel abban az esetben is, ha a talajfertőtlenítést elvégezték, de fertőzött palántákat ültettek. (Farkas és Andrássy, 1988).

A *M. incognita* sok esetben jelenik meg *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Trichoderma* és *Alternaria* fajokkal együtt, de baktériumok mellett gombákkal is társulhat, mint például a *Pseudomonas caryophylli* (Farkas és Andrássy, 1988).

A gyökérgubacs fonálféreg az egyik legkárosítóbb patogénekként vannak számon tartva a világon (Trudgil és Blok, 2001). Jelenleg az egyik legmegbízhatóbb, és leghatásosabb védekezési módszer ellenük a kémiai védekezés, mint például folyékony fertőtlenítőszer (pl. metám-ammónium) talajba injektálása vagy talajfertőtlenítő granulátumok (dazomet) kiszórása (Glits *et al.*, 1997). Korábban legtöbbször alkalmazott módszer a talaj fertőtlenítés volt metil-bromidos gázosítással, ám ennek az alkalmazását 2005-től az Európai Unió betiltotta (<http3>). Emiatt szükségszerűvé vált alternatív védekezési módok után nézni, melyek közül, az egyik legkörnyezetkímélőbb megoldás a rezisztencia nemesítés (Dijan-

Caporalino *et al.*, 2007). Ez a módszer hatékonyan szabályozza a gyökérgubacs fonálféreg populációkat, gazdaságilag fenntartható, valamint ártalmatlan az egészségre és a környezetre. A rezisztenciáért általában egy főbb R-gén felel, mely viszonylag könnyen bejuttatható kultúrfajtákba hagyományos nemesítési eljárásokkal (back-cross) és fenotipizálással, vagy marker alapú szelektációs (MAS) módszerekkel. Ennek okán, ezek az R-gének széleskörben használtak gyökérgubacs fonálféreg rezisztencianemesítési programokban, azonban hatékonyságuk veszélyben van az RKN adaptációs képességei miatt (Barbary *et al.*, 2016), hiszen a rezisztencia gének egy szelektációs nyomást helyeznek a gyökérgubacs fonálféregre, ezzel növelve az esélyt, hogy olyan populációk jelenjenek meg, melyek képesek idővel áttörni a rezisztenciát (Castagnone-Sereno, 2006). A paprikában számos domináns R-gént azonosítottak már a gyökérgubacs fonálféreggel szemben, ezeket *Me* géneknek nevezzük. (Hendy *et al.*, 1985; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Thies and Fery 2000).

2.2. *Capsicum annuum*

A paprika (*Capsicum spp.*) az egyik legjelentősebb, világszerte termesztett zöldségnövény, amelyet gazdasági jelentősége és tápértéke miatt nagyra értékelnek. Rendszertanilag a *Solanaceae* családba tartozik, amely több mint 90 nemzetségből áll, köztük olyan más kereskedelmileg fontos zöldségnövényekkel, mint a paradicsom (*Solanum lycopersicum*), vagy a tojásgyümölcs (*Solanum melongena*). Géncentruma Közép- és Dél-Amerika (Zatykó, 2004). A *Capsicum* nemzetségbe több, mint 30 faj tartozik, ebből öt (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* és *C. pubescens*) került köztermesztésbe, és főként étkezési, és ipari célú felhasználásra (pl.: kozmetikumok) termesztik (Parisi *et al.*, 2020). A paprika termesztése az elmúlt 20 évben folyamatosan növekedett, termésmennyisége a világon nagyjából 19 millió tonnáról negyvenre, míg a termőfelülete 2,5-ről 3,8 millió hektárra növekedett. A világ paprikatermelő országai között Kína áll az első helyen, míg Európában Törökország, Spanyolország, Hollandia, és Olaszország áll az élen. Magyarország méreteihez viszonyítva igen kimagasló helyen áll paprika termesztés szempontjából. A FAOSTAT 2021-es adatai szerint Magyarország több mint 90 ezer tonna étkezési paprikát termesztett a 2021-es évben, amivel olyan, jóval nagyobb területű országokat hagyunk le, mint Franciaország vagy Németország. A paprikatermelés európai átlaga 37 t/ha míg Magyarországon ez a szám 56 t/ha volt 2021-ben (http4). Hazánkban az étkezési paprika a legnagyobb felületen hajtattott zöldségnövény, termőterülete nagyjából 1500-1600 ha, ezzel szemben szabadföldi termesztése 600 hektár körüli (http5). Magyarországon a paprikafogyasztás igen kimagasló, hiszen egy

2012-ben elvégzett felmérés alapján egy háztartás 15,2 kg paprikát vásárolt az évben. Ezt a mennyiséget csak a hagyma (16,9 kg) és a káposzta (15,7 kg) mennyisége előzte meg (<http6>).

2.3.Rezisztencia gének

2.3.1. Növény patogén harc

A növényekből hiányzik az úgynevezett adaptív immunitás, ami a gerincesekben a patogének elleni védekezést szolgálja. Sok esetben a védekezési mód eltérő lehet egyes fajokban, de általánosságban két védelmi vonalat lehet megkülönböztetni a növényeken belül. Első védelmi vonal a transzmembrán receptorok, melyek felismerik a kórokozóra jellemző molekuláris mintázatokat röviden PAMP-okat (Pathogen associated molecular patterns), melyek evolúciósan igen konzerváltak, és sokszor elengedhetetlenek a patogén életben maradásához, ilyenek lehetnek például a baktériumok flagellumai, lipopoliszacharidok, vagy egyes sejtfal alkotó strukturális elemek (DeYoung és Innes, 2006). Felismerés következtében a receptorok aktiválják a növény alapvédelmet, ami nagyban hasonlíthat a gerincesekben ismert veleszületett immunitásra. Második védelmi vonalnak pedig a rezisztencia géneket (R gének) tekintjük. Ebben az esetben a növény a patogén avirulencia génjei (*Avr* gének) által termelt effektor fehérjét ismeri fel. Az effektor fehérjék egy evolúciós előrelépést jelentettek a patogének számára, mivel segítségükkel kikerülhették a PAMP felismerését és/vagy elnyomhatták a növény védelmi válaszait, ezáltal megfertőzve, és látható tüneteket okozva a növényen. Ennek hatására a növények tovább fejlődve olyan fehérjét kezdtek el termelni melyek ezeket az effektorokat ismerik fel, ezt a mechanizmust úgy nevezzük, hogy effektor-indukálta immunitás. Természetesen ez egy örök folyamat, mely során a patogén újabb és újabb effektorokat kezd el termelni, melyre a növénynek nincs megfelelő receptora, emiatt a növény újabb és újabb felismerő fehérjét kezd el termelni, védve magát a patogén ellen. Ezt a folyamatot nevezzük növény-patogén harcnak (Hammond-Kosack és Kanyuka, 2007).

2.3.2. Rezisztencia gének

A rezisztencia gének a fent említett második védelmi vonalban játszanak elengedhetetlen szerepet, ugyanis ezek a gének kódolják, a patogén avirulencia génjei által termelt effektorok felismerő receptorait. Érdekes módon az egy- és kétszikű növények rezisztencia génjei között igen nagy fokú hasonlóság van, mely azt jelentheti, hogy a patogének felismerése és az ellenük való védekezés alapvető módjai a növények evolúciója és diverzifikációja során megmaradtak. A rezisztencia gének legrepresentáltabb csoportja az NBS-LRR osztályba tartozó gének (Marone *et al.*, 2013). Az NBS-LRR fehérjét az N-

terminális végükön jelenlévő domének alapján, két főbb alcsoportra oszthatjuk. A TIR-NBS-LRR (TNL), amelyek Toll/Interleucin-1 doméneket tartalmaznak és CC-NBS-LRR, (CNL) melyek egy coiled-coil domént tartalmaznak. (Shao *et al.*, 2018). Ezek az NBS-LRR olyan receptorok, melyek a patogén avirulencia génjei által termelt effektorokat ismerik fel, a növénybe jutás után. Ezt a receptor-effektor kölcsönhatást nevezzük 'gén a génnel' rezisztenciának, mely során egy specifikus felismerési reakció és szignál transzdukciós lánc megy végbe. (Szabadi *et al.*, 2016) A növények a felismerést követően egy védelmi választ indítanak el, melyre jellemző a gyors kalcium- és ion fluxusok, extracelluláris oxidatív molekulák felhalmozódása, transzkripció átprogramozás a fertőzési helyeken és azok körül, valamint a legtöbb esetben lokalizált programozott sejthalál. Ezt a reakciót nevezzük hiperszenzitív válasznak (Belkhadir, 2004). Genetikai elemzések során megállapították, hogy a növényi genomok akár több ezer NBS-LRR-t kódolhatnak, óriási bennük a diverzitás, valamint az alcsoportok eloszlása is igen változatos. Ezek az adatok napról napra változhatnak, bővíhetnek az újonnan megjelenő kutatások miatt. (Marone *et al.*, 2013). Az NBS-LRR gének kromoszómális eloszlása a legtöbb vizsgált fajnál nagyon szabálytalannak tűnik, egyes kromoszómákra sokkal több NBS-LRR jellemző, mint a többire, de az, hogy mely kromoszóma az, ahol több NBS-LRR található fajonként változhat. Burgonyánál például a 4. és a 11. kromoszóma tartalmazza a legtöbb NBS-LRR-t, ahol a feltérképezett gének 15%-a NBS-LRR volt, míg a legkevesebb a 3. kromoszómán található, itt az NBS-LRR-ek aránya csupán 1 %. A fajonként eltérő elrendeződést jól mutatja, hogy míg a burgonya esetében a 4. és a 11. kromoszómán található a legtöbb, addig *Brassica rapa*-ban a 3. és 9. kromoszómán, *Lotus japonicus*-ban a 2. és a 3., *Medicago truncatula*-ban pedig a 3., 4., és a 6. kromoszómán. (Mun *et al.*, 2009, Song *et al.*, 2015, Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008). Genetikai mechanizmusok, mint a duplikáció, crossing over, ektopikus rekombináció, génkonverziók, és egyéb szelekciós hatások mind hozzájárultak az R gének és az általuk kódolt rezisztencia fejlődéséhez (McHale *et al.*, 2006).

2.3.3. *Me* rezisztencia gének

A gyökérgubacs fonálféreg elleni rezisztenciáért paprikában a *Me*, valamint az *N* gének felelősek. Összesen 10 darab domináns *Meloidogyne spp.* rezisztencia gén van a paprikában (*Me1*-től *Me7*-ig, *Mech1*, *Mech2* és *N*) (Dijan-Caporalino *et al.*, 2007; Fazari *et al.*, 2012). Ezen gének közül négy (*Me1*, *Me3*, *Me7* és *N*) gyökérgubacs fonálféreg fajok széles köre ellen nyújt védelmet, míg a többi gén csak egy-egy faj ellen biztosít rezisztenciát. (Dijan-Caporalino *et al.*, 1999, Hendy *et al.*, 1985). A *Me* és *N* gének a paprika P9-es kromoszómáján egy 28 cM-es

klaszterbe rendeződve vannak jelen (Uncu *et al.*, 2015). Rezisztenciájuknak két fféle folyamata van, egyes gének, mint a *Me3* és a *Me7* a fertőzés korai fázisában biztosít rezisztenciát, míg más gének, mint például a *Me1* az óriássejt kialakulásában részt vevő effektorok indukálnak, ezáltal a fertőzési folyamat későbbi fázisában gátolják a fertőzést (Szabadi *et al.*, 2013). Az eddig leírt *Me* gének közül három a *Me1*, *Me3*, és a *Me7* hőstabilnak bizonyult egészen 42 °C-ig, mely hasznos tulajdonság lehet a trópusi, illetve üvegházi klimatikus viszonyok során (Dijan-Caporalino *et al.*, 1999).

Egy 2014-es kutatás során Barbary és munkatársai a *Me1* és a *Me3* gén hatékonyságát vizsgálták. Munkájuk során négy különböző genotípusú paprika fajtaival dolgoztak: a Yolo Wonderrel (YW) a Doux Long des Landes-sel (DLL), a DH149, és a DH330-as fajtaival. A DLL nagyon fogékony, a YW részlegesen rezisztens (csökkent tüneteket mutat), míg a DH149 és a DH330, melyek a *Me3* és *Me1* géneket tartalmazzák, teljesen rezisztensek. Mindkét DH fajta külön-külön keresztezve lett a DLL és a YW fajtaival. A szükséges back-cross keresztezéseket követő vizsgálatok során bebizonyították, hogy a rekurrens fajták genetikai háttere hatással lehet a rezisztencia kialakulására, hiszen nem egyforma mértékű rezisztenciát kaptak a *Me* gének bejuttatása után sem (Barbary *et al.*, 2014). Egyik legújabb kutatás a témában 2022-ben jelent meg, melyben sikeresen izolálták és klónozták a *Me3* gént. (Liu *et al.*, 2022).

Az összes eddigi kutatás folyamán egyértelművé vált, hogy a *Me* gének közül a *Me1* tűnik a leghatékonyabbnak, hiszen olyan fonálféreg vonalak ellen is rezisztenciát tud nyújtani, amelyek a *Me3* és *Me7* rezisztenciáját már áttörték (Castagnone-Sereno *et al.*, 1996, 2001). Így a nemesítési programok nagy figyelmet fordítanak a *Me1* génre, és még nagyobbat olyan parika vonalakra melyek együtt hordozzák a *Me1* és *Me3* gént, melyek így a legtöbb gyökérgubacs fonálféreg vonal ellen hatékony és stabil védelmet nyújtanak (Dijan-Caporalino *et al.*, 2014).

2.4.Molekuláris markerek

2.4.1. Bevezetés

A genetikai markerek egyik első felismerőjének Gregor Mendel-t tekinthetjük, aki öröklődési szabályszerűségek tanulmányozása során, a borsónövényeket nem egy egész, és emiatt átláthatatlanul bonyolult rendszerként kezelte, hanem csak néhány, jól meghatározható morfológiai marker törvényszerűségeire koncentrált (Pedryc, 2008). Mendel a genetikai alaptörvények felfedezésével, Morgan és Sturtevant a gének sorrendjének kísérleti úton történő meghatározásával, valamint számos kimagasló genetikus munkássága lehetővé tette a genetikai analízist. A genetika, mint tudományág egyik legfontosabb eredménye, hogy a morfológiai

mutációkat hordozó egyedek keresztezésével és az utódok genetikai analízisével a géneket kapcsoltsági csoportokba lehet sorolni és ezeken belül a gének sorrendjét, meglehetősen állapítani. A genetikai módszerekkel meghatározott génsorrend grafikus ábrázolása a genetikai térkép. Az egyes élőlények géntérképei tették lehetővé, hogy betekintést nyerjünk az örökítő anyag rejtelseibe, megtudjuk azt, hogy hozzávetőlegesen mennyi gén van, és azok milyen funkcióval rendelkeznek, az adott egyeden, fajon belül (Kiss és Endre, 2004). A klasszikus genetikai térképezés során legtöbbször a természetben előforduló, vagy indukált morfológiai különbségeket alkalmazták genetikai markerként, majd ezeket követték a különböző másodlagos anyagcsere termékek, mint például az antocianinok, vagy fenolok. Ezekről a markerekről azonban hamar kiderült, hogy egyáltalán nem hatékonyak, hiszen nagyon instabilak, sokszor függenek környezeti hatásoktól, igen kis számban elérhetőek, és sok esetben kiértékelésük sem egyértelmű (Kiss és Endre, 2004; Grover és Sharma, 2016; Törjék, 2001). Az 1970-es évektől egy rövid időre a különböző enzimmarkerek (allozimek és izoenzimek) nyertek teret, melyek veszte szintén az alacsony számuk, és megbízhatatlanságuk volt. Egészen a 80-as évekig próbálták őket alkalmazni, elsősorban a nemesítési szelekció során, mind addig míg meg nem jelentek a molekuláris – DNS – alapú markerek. (Grover és Sharma, 2016; Tanksley, 1983). „Definíció szerint molekuláris markernek azt a valamilyen módon kimutatható DNS-szakaszt értjük, amely képes a genomszintű változékonyság kimutatására. A molekuláris markerek nem szükségszerűen korrelálnak a tulajdonságok fenotípusban való megjelenésével. A morfológiai markerekhez képest a molekuláris markerek általánosítható előnye a szövettől, fejlődési fázistól való függetlenségük. Egyes markerek esetében viszont, mint például izoenzim-mintázatok vagy a cDNS szekvenciára építő eljárásoknál, éppen az adott növényi szövetekben vagy az ontogenezis egyes folyamataiban fellépő polimorfizmus rögzíthető a megfelelő markerrendszer segítségével. A markerek jelenlétét nem befolyásolják a környezeti tényezők, pleiotróp és episztatikus hatások” (Pedryc, 2008). Az ideális marker legfőbb tulajdonságai, hogy magas polimorfizmust mutat, kodomináns öröklődésű, vagyis diploidoknál megkülönböztethetőek a homo- és heterozigóták, a teljes genomban egyenletesen és gyakran előfordul, stabil, bármely szövetből, és bármely fejlődési állapotban detektálható, vizsgálata gyors, könnyű, megismételhető, valamint kis mennyiségű mintával is elvégezhető és költséghatékony. Sajnos jelenleg egyik molekuláris markerezési módszer sem elégíti ki teljesen a felsorolt tulajdonságokat, így az adott kutatás megkezdése előtt fontos végig gondolni, mely technika lehet a legalkalmasabb figyelembe véve, az infrastruktúrát, a költségvetést, a szakmai hozzáértést, és természetesen a kutatás célját is (György, 2013, 2022).

2.4.2. Molekuláris markerek típusai

Molekuláris markereket többféleképpen csoportosíthatjuk, az egyik legáltalánosabb csoportosítás szerint megkülönböztethetünk domináns és kodomináns csoportokat aszerint, hogy segítségükkel diploid növényeknél meg lehet-e különböztetni a homo- és heterozigóta egyedeket (Hartl, 1988). A legtöbbet alkalmazott domináns markerek közé soroljuk a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Sequence Characterised amplified regions (SCAR), és az Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Ko-domináns markerek közül pedig a Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), Mikroszatellitek (SSR), és a Cleaved amplified Polymorphism (CAPS) a legelterjedtebbek (Idrees és Irshad, 2014).

2.4.2.1. RAPD

A PCR technika felfedezése és elterjedése után, az egyik első markerezési eljárás az RAPD volt, melyet egymástól függetlenül Williams és munkatársai, valamint Welsh és McClelland publikáltak 1990-ben. Lényege, hogy rövid (6-12 bp hosszúságú) random primerek segítségével különböző eredetű DNS-ek polimorfizmusait mutathatjuk ki. Abban az esetben, ha két primer kötődési helye csak néhány kbp-nyi távolságra van egymástól, végbemegy közöttük az amplifikáció, így a polimorfizmus a két DNS közötti amplifikációk közötti különbségekből, valamint azok meglétéből vagy hiányából mutathatóak ki (György 2013).

2.4.2.2. ISSR

Az ISSR egy, a mikroszatellit régiókra alapuló markerezési eljárás. Elsőként 1994-ben Zietkiewicz és munkatársai írták le. Ellentétben az SSR markerekkel, nem szükséges hozzájuk szekvencia ismeret, hiszen itt a primereket magára a mikroszatellit régióra tervezzük. A primerek általában 15-30 bp hosszúságúak, és a 3' vagy az 5' végükön túlnyúlnak a mikroszatellit régió, ezzel biztosítva azt, hogy egyetlen szakasról ne készüljön egynél több termék ezzel fals eredményt mutatva. Az ISSR markereket legtöbbször genetikai diverzitás vizsgálatra, fajta megkülönböztetésre, valamint genetikai térképek szerkesztéséhez használják (Fang és Roose, 1997, Moreno *et al.*, 1997).

2.4.2.3. AFLP

Az AFLP módszer lényegében az RFLP és a PCR technika egybeolvasztása. Első lépésben restriktions enzimmel emésztjük a DNS-t, majd az emésztés után olyan adaptereket ligálunk a végükre, melyeknek a szekvenciájuk ismertek, így lehetséges rájuk a primer tervezés. A PCR során az adapter régiókra tervezett primerekkel az emésztési helyek közötti szakaszokat

szaporítjuk fel. A polimorfizmus ezeknek a szakaszoknak a méretkülönbségéből adódik. Genetika térkép, DNS-ujjlenyomat készítéséhez, fajta elkülönítésre, valamint genetikai diverzitás vizsgálatára használják (Paun és Schönswetter, 2012).

2.4.2.4. RFLP

Az RFLP módszer az első markerezési eljárás volt, és az egyetlen, ami hibridizációs eljárásról alapszik. Alkalmazása során itt is restriktív enzimmel emésztjük a DNS-t, melyet ezután agaróz, vagy poliakrilamid gélen elválasztunk. majd Southern hibridizáció során a DNS-fragmentumokat egy membránra visszük át, ezután pedig DNS-próbával hibridizáljuk. Alkalmazzák allélpolimorfizmus kimutatására, fajtaazonosításra és térképezésre (Nadeem *et al.*, 2018).

2.4.2.5. SSR

A SSR, vagy másnéven mikroszatellit markerek, a DNS nem kódoló szekvenciákban található 2-5 bp hosszúságú, ismétlődő és nagy polimorfizmust mutató szekvenciákra épülő markerezési eljárás. A mikroszatelliteket határoló szekvenciák fajon belül általában igen konzerváltak, így ezekre a régiókra tervezett primerekkel a közbeeső mikrosatellit régiók PCR-rel felszaporíthatóak. Magas polimorfizmusuknak köszönhetően széleskörben alkalmazhatóak, leginkább populációgenetikai vizsgálatokra, kapcsoltsági térképek készítésére és fajtaazonosításra használják őket. Hátrányuk, hogy a primertervezés igen költség- és munkaigényes, valamint sokszor 2 vagy 4 bázispár különbség van a fragmentumok között, így nagy felbontóképességű poliakrilamid gélen kell őket elválasztani, és a pontos fragmentumméret meghatározása is költséges lehet (György, 2013, 2022).

2.4.2.6. SCAR

A SCAR markerek általában az RAPD markerekből indulnak ki, de használhatóak hozzá a ISSR és az AFLP markerek is. Lényege, hogy az adott markerezési eljárásból a számunkra értékes fragmentumot kivágjuk a gélből, visszatisztítjuk, majd szekvenáljuk, így egy már ismert szekvenciára tudunk primert tervezni (György, 2022).

2.4.2.7. CAPS

A CAPS markerek az RFLP módszerhez hasonlóan, restriktív enzim használatán alapszik, azzal a különbséggel, hogy míg az RFLP-nél az egész DNS-t emésztjük, itt, csak egy általunk kiválasztott fragmentumot. Lényege, hogy a hossz-polimorfizmus a restriktív helyen egy SNP vagy indel jelenléte vagy hiánya miatt jön létre. A genom bármely génje vagy fragmentuma használható CAPS markerezésre, ahol a restriktív helyen korábban

azonosítottak már SNP-t vagy indel-t. Elsősorban genotipizálásra, genetikai térképezésre, vagy fajtaazonosításra alkalmazzák (György, 2022).

2.4.3. Genetikai térképezés

Genetikai térképezésnek azt a folyamatot nevezzük, mikor különféle molekuláris markerek segítségével meghatározzuk egyes gének egymáshoz viszonyított helyzetét és távolságát a genomon. A legelső genetikai térkép T.H. Morgan és Alfred Sturtevant nevéhez köthető, akik hat, nemhez kapcsolható gént térképeztek fel a gyümölcslegyek kromoszómáin, 1911-ben (Semagn *et al.*, 2006). Egy részletes genetikai térkép magas szintű genomi lefedettséggel az első lépés a marker alapú növénynevelés során (Tanksley *et al.*, 1989), és főbb céljai, hogy:

- Lehetővé teszi a minőségi és mennyiségi tulajdonságok részletes genetikai elemzését, mellyel lehetővé válnak a gének lokalizációja (Yim *et al.*, 2002),
- A számunkra értékes gének introgressziójának elősegítése marker asszisztált szelekció során,
- Lehetővé tesz összehasonlító térképezést különböző fajok között, annak érdekében, hogy egyes gének, valamint azok sorrendje és funkciója között a hasonlóságokat, és különbségeket vizsgáljuk (Paterson *et al.*, 2000),

Ahhoz, hogy egy kapcsoltsági térkép teljes mértékben hasznosnak bizonyuljon egyszerűen kivitelezhetőnek, gyorsnak, költséghatékonynak, és megismételhetőnek kell lennie (Lorieux *et al.*, 2000).

A genetikai térképezés azon az elven alapul, hogy a gének (illetve a markerek vagy a lokuszok) kromoszóma-rekombináció útján szegregálódnak a meiózis (azaz ivaros szaporodás) során, így lehetővé válik az utódokban történő elemzésük (Paterson, 1996). A meiózis során a homológ kromoszómák párokba rendeződnek, majd megtörténik közöttük a crossing over, így az egyik gén alléljainak szegregációja független a másik gén alléljaitól. Ezt Mendel második törvénye mondja ki, és a független öröklődés törvényeként ismert. A független öröklődés törvénye mindig érvényes a különböző kromoszómákon található génekre, de nem mindig igaz azokra a génekre, amelyek ugyanazon kromoszómán találhatóak. Abban az esetben, ha két gén közel van egymáshoz ugyanazon a kromoszómán, nem rendeződnek el egymástól függetlenül, azaz egymáshoz kapcsoltnak nevezzük őket. Az egymáshoz közelebbi vagy szorosan kapcsolódó gének gyakrabban öröklődnek együtt, mint a nem kapcsolt gének (Semagn *et al.*, 2006).

Jelenleg többféle módszer is létezik térképezési populációk kialakítására, ilyen például az F2, back-cross (BC), dihaploid (DH), rekombináns beltenyésztett (RIL), valamint a near isogenic (NIL) vonalak. Ezen módszerek közül a legtöbbet alkalmazott térképezési populáció az F2 nemzedék. Lényege, hogy az F2 populációt két homozigóta szülő egyed keresztezéséből létre jött F1 nemzedék önbeporzásával állítjuk elő, ahol az utódok lokusza 1:2:1 arányban hasadnak (Kiss és Endre, 1994).

2.4.4. Színtérkép

Egy általános grafikai térkép szerkesztése során a növényeket és a hozzájuk tartozó lokuszokat táblázatba helyezzük, ahol a vízszintes sorban a növény egyedeket találhatók, míg függőlegesen a vizsgált lokuszok. Az így kitöltött táblázatból egyértelműen meghatározható a kapcsoltság, és a lokuszok genotípusa. Az egyszerű átláthatóság érdekében a genotípusokat számokkal jelölik, ahol az 1: anyai homozigóta, 2: heterozigóta, 3: apai homozigóta, 4: nem anyai homozigóta, 5: nem apai homozigóta, és a 0: genotípus nem ismert. Viszont a térképezés előrehaladásával ez az adathalmaz fokozatosan egyre nagyobb lesz, és az óriási táblázatban a számjelölések átlátása egy idő után igen nehézkesé válhat, ebben segít a színtérkép létrehozása, mely során a számokat, színekkel helyettesítjük, így még egyszerűbbé téve a genotípusok pontos meghatározását (3. ábra) (Kiss és Endre, 1994).

Genetikai marker	Genotípus kategóriák																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TM1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	1
TM2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
SCAR-CD	4	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
TM6	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
TM3	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
Me1 genotípus	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
741A	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2
SSR9	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
TM5	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2
TM4	2	2	2	2	1	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2
Vizsgált növények száma	12	2	7	6	7	11	11	8	7	5	214	8	3	4	6	4	105	9	6	4

3. ábra: Me1 rekombináns utódok színtérképe

2.5. Genetikai transzformáció

2.5.1. Általános géntranszfer

A genetikai transzformáció egy DNS szakasz bejuttatását jelenti az élő sejt genomjába. A transzformáció így lehetővé teszi, hogy egy korlátozott hosszúságú DNS-szakaszt építsünk be a növény genomjába, úgy, hogy az stabilan öröklődjön. A géntranszfer történhet más fajtól

származó DNS-szakasszal, de akár a saját faj genomjából is. Az utóbbi esetben lehetséges lenne keresztezéssel bejuttatni a számunkra fontos DNS-szakaszt, de ebben az esetben kevésbé lenne precíz az átvitel, és nem tudnánk szabadon változtatni a gén szabályozását. A precizitás mellett egy másik érv a genetikai transzformáció mellett, hogy a bejuttatni kívánt DNS-szakasz származhat szinte bármilyen élőlényből, tehát a genetikai távolság kisebb mértékben jelent akadályt, mint a hagyományos keresztezéses módszernél. Természetesen minden esetben figyelembe kell vennünk, hogy a bevitt gén megfelelően működjön együtt az anyagcsererendszer többi elemével. A sikeres transzformációhoz nem elegendő a kiválasztott DNS-szakasz, hanem egy úgy nevezett transzgén konstrukciót kell létrehoznunk, mely három fő elemből épül fel: a promoter régióból, a kódoló szakaszból, valamint a terminátor régióból. A promóter a génünk kifejeződéséért és működéséért felel, a kódoló szakasz az általunk kiválasztott gén, míg a terminációs régió az RNS átírásnak a lezárását jelzi az RNS-polimeráz számára. A bejuttatás módja szerint megkülönböztetünk közvetett, és közvetlen módszereket. (Oláh és Zok, 2013). Közvetlen módszer során a transzgént mi magunk juttatjuk be a célszövet sejtjeibe. Sokféle közvetlen módszerrel értek már el sikeres génbevitelt, többek között génpuskával, protoplasztok PEG-es kezelésével, szilikon-karbid rostokkal, mikro- és makroinjektálással, illetve vákummal. A számos publikált közvetlen technika közül azonban a biolitikus módszer a legtöbbször alkalmazott a kultúrnövények körében. Közvetett módszer esetében viszont nem magunk, hanem egy másik élő szervezet (vírus, baktérium) segítségével juttatjuk be a transzgént a növény sejtjébe. Jelenleg leghatékonyabb módja a közvetett géntranszfernek, az agrobaktérium közvetített transzformáció (Heszky, 2011).

2.5.2. Agrobaktérium közvetített genetikai transzformáció

Az agrobaktérium fajok a *Rhizobiaceae* családba tartozó Gram-negatív, talajlakó és növénypatogén baktériumok. Az *Agrobacterium* alcsalád két, számunkra legfontosabb tagja az *Agrobacterium tumefaciens*, és az *Agrobacterium rhizogenes*. Az *Agrobacterium* fajok kétszikű növényeket fertőznek, azok sebzési felületein keresztül. A fertőzött növényeken az *A. tumefaciens* tumornövekedést indukál. Zaenen és munkatársai 1974-ben bizonyították be, hogy az *A. tumefaciens* által kiváltott tumorképződés, valamint az opinszintézis összefügg egy nagy plazmid, a tumorindukáló, röviden Ti-plazmid jelenlétével (Agrawal és Rami, 2022). Később több laboratórium is igazolta, hogy a Ti-plazmid egy kis része az úgynevezett transzfer DNS (T-DNS) a baktériumfertőzés során átkerül a növényi sejtekbe, ahol stabilan integrálódik a sejt DNS-ébe. A sérült növényi részek különböző fenolvegyületeket (pl.: acetosyringon) bocsátanak ki, melyek aktiválják a baktérium Ti-plazmidján elhelyezkedő virulencia génjeit. A

virulencia gének hatására a plazmidból a T-DNS szakasz kivágódik, és a baktérium további géneinek segítségével bejut a növényi sejtekbe, ahol a T-DNS bal- és jobboldali határszekvenciák segítségével integrálódik a növény sejtmagi DNS-ébe (Heszky és Dudits, 2014). Ahhoz, hogy az agrobaktériumot gyakorlatban is használhassuk géntranszformálásra, szükséges volt azok plazmidjainak 'lefegyverzése', vagyis a T-DNS két határszekvenciái közötti szakaszokat, melyek a tumor indukálásért felelősek kivágták, hogy helyettük, különböző gazdaságilag fontos gének, valamint markergének legyenek beépíthetőek. Az agrobaktériumos géntranszformáció legnagyobb előnye a közvetlen módszerekkel szemben, hogy alacsony kópiaszám jut be a sejtmagi DNS-be, így kisebb az esélye a későbbi géncsendesítés kialakulásának. Nagy molekulatömegű DNS vihető be, ezzel lehetővé téve, hogy egy lépésben több gént építsünk be, valamint viszonylag egyszerű és költséghatékony az alkalmazása (Heszky, 2011).

2.5.3. *Agrobacterium rhizogenes*

Az *Agrobacterium rhizogenes* közvetítette transzformáció nagyban megegyezik az *A. tumefaciens*-nél leírtakkal. A különbség a két faj között, hogy az *A. rhizogenes*-ben a Ti-plazmid helyett egy Ri-plazmid található, amely a növények gyökereibe juttatja be a T-DNS-t, ezáltal tumor helyett hajszálgyökér növekedést indukál. Használata lehetőséget nyújt gyökérben működő és különböző gyökérspecifikus kórokozókkal szembeni rezisztenciát biztosító gének működésének, valamint gyökér-patogén interakciók vizsgálatára (Alpizar *et al.*, 2006). Egyik legnagyobb előnye a transzformáció gyorsasága és technikai egyszerűsége, valamint, hogy az *A. tumefaciens* közvetítette transzformációt követő 4-6 hónapos növény regenerációs idő helyett a transzgénikus gyökerek fejlődése csak 6-8 hetet vesz igénybe (Veena és Taylor, 2007). Az *A. rhizogenes* által közvetített transzformáció során a gyökértenyészetekből közvetlenül regenerálhatóak növények, így elkerülhetőek az *A. tumefaciens* alkalmazásánál megjelenő szomaklonális variabilitás okozta problémák (Roychowdhury *et al.*, 2012). A paprika növények rekalcitránsok az *A. tumefaciens*-el történő transzformációra, valamint az *in vitro* növényregenerációra nézve is, így jelenleg a gyökérpatogén fajok ellen rezisztenciát biztosító gének vizsgálatára paprika fajokon, az *A. rhizogenes* nyújtja a leghatékonyabb megoldást (Kifle *et al.*, 1999, Hwang *et al.*, 2000).

3. Anyag és módszer

3.1.A munka előzményei

Diplomamunkám során a Genetika és Biotechnológia Intézet Alkalmazott Növénygenomikai csoportjának a *Meloidogyne* fajokkal szemben rezisztenciát biztosító *Mel* génnel kapcsolatos kutatásába kapcsolódtam be. Az elmúlt néhány évben sikeresen azonosították a *Mel* gén kromoszómális helyzetét. Ezt követően a csoport létrehozott egy 4500 darab F2 egyedből álló térképező populációt, mely szegregál a *Mel* génre. A térképező populációt a szenzitív Fehérözön fajta és a rezisztens PI201234 keresztezéséből származó F1 populáció öntermékenyítésével állították elő. A szülő egyedek genomját szekvenálták, majd a rekombináns utódok segítségével a *Mel* génhez kapcsolt saját fejlesztésű markerek alkalmazásával szűkítették le a *Mel* régióját egy kb. 70 kbp-os régióra. A genomi régió paprika genom adatbázisok és bioinformatikai módszerek segítségével két gént azonosítottak, melyek közül az egyik jelölt gén egy olyan fehérjét kódol mely NBS (Nucleotide-Binding Site) - LRR (Leucine-Rich Repeat) motívumokat tartalmaz (NBLR1), a másik pedig egy feltehetően sejtanyagcsere szabályozó transzkripciós faktor (TF1). 2022 végén az NCBI adatbázis paprika referencia genom szekvenálási és szekvencia illesztési eredmények alapján, a Softberry FGENESH génpredikciós algoritmusát használva még egy génjelöltet sikerült prediktálni (NBLR2), mely szintén egy NBS-LRR motívumokat tartalmazó gén. Ezt a feltételezést RNS szekvenálásból származó readok segítségével erősítették meg. Az NBLR2 gén elején és végén található szekvenciák olyan repetitív szakaszokat tartalmaznak, amelyek nagyban hasonlítanak az NBLR1-es génhez, ezért amplifikációja nehézkes és jelenleg is folyamatban van.

3.2.Növényi minták feldolgozása

A DNS és RNS izoláláshoz a kiválasztott növény egyedek fiatal leveleiről 1 g levélmintát gyűjtöttünk. A levélkorong mintákat DNS izolálás esetében homogenizátor segítségével roncsoltuk szét a sejtfal felnyitásának és a DNS feltárásának érdekében. Az RNS minták izolálásához dörzsoszárban folyékony nitrogén segítségével porítottuk finomszemcséjűre a növénymintákat előre lehűtött eszközökkel, a lehető legjobb minőségű porítás érdekében.

3.2.1. DNS-izolálás

A növényi mintákat a Mini-Beadbeater-96 (BioSpec Products) homogenizátorban roncsoltuk 2400 RPM-en 1 percig. DNS-izoláláshoz a Zenogene növény DNS tisztító kitjét használtuk a gyártó utasításai alapján. A tisztítási folyamatot követően a mintákat 80 µl végtérfogatú eluáló oldatba oldottuk le, majd Nanodrop készüléken ellenőriztük a koncentrációjukat. A mintákat -20 °C-on tároltuk.

3.2.2. RNS-izolálás

RNS-izoláláshoz a rezisztens szülő gyökér mintáit használtuk. 1 g mennyiségű mintát előre lehűtött dörzsmozsárban, folyékony nitrogén segítségével 2-3 percig dörzsölve porítottuk. Minden mintához új steril eszközöket (dörzsmozsár, pisztillus, üvegpálca) használtunk, a minták keveredésének, és az ebből származó kontamináció elkerülése érdekében. Az RNS-izolálást a Promega SV Total RNA Isolation System kitjével végeztük a gyártó utasításai alapján. Az RNS-mintákat -80 °C-on tároltuk.

3.2.3. cDNS szintézis

Ahhoz, hogy az előzőleg kivont RNS-mintákból PCR segítségével fragmentumot tudjunk amplifikálni először cDNS-é kellett írunk őket. A cDNS-szintézist a Thermo Scientific™ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-tel végeztük a gyártó utasításai alapján. A reakciót 20 µl végtérfogatban folytattuk le reverz transzkriptáz segítségével. A mintákat -20 °C-on tároltuk a következő munkafázis megkezdéséig.

3.2.4. Szekvenálás

A génjelölteket tisztított PCR termékként vagy plazmidba juttatva küldtük szekvencia meghatározásra, amelyet a Biomi Kft. végzett. A mintákat és a szükséges primereket 10 µl térfogatba küldtük le. A beküldött mintákat ABI 3130XL készülék segítségével szekvenálták, majd a kapott szekvenciákat *in silico* elemeztük DNA STAR SeqMan software segítségével.

3.3.Szekvenciák molekuláris vizsgálata

3.3.1. PCR

Az *E. coli* és agrobaktérium telepek ellenőrzésére alkalmazott kolónia PCR-hez, valamint a rekombináns utódok genotípus ellenőrzésére hagyományos Taq polimerázt, míg a génjelöltek amplifikációjára egy magas hatékonyságú HiFi (high-fidelity) polimerázt használtunk.

3.3.1.1. Kolónia PCR

A Kolónia PCR során az ellenőrizni kívánt telepeket pipettaheggyel szedtük le a táptalajról, majd óvatosan áthúztuk a master plate-re. A pipettahegyeket ezután a PCR csövekbe helyeztük, így a pipetta hegyen maradt baktériumok a reakcióelegybe kerültek, mint templát DNS. A reakciót 12 µl végtérfogatban folytattuk le hagyományos Taq polimeráz segítségével. A reakcióhoz kolóniánként 1,2 µl DreamTaq 10x puffert, 0,3 µl dNTP-t (10mM), 1-1 µl primert (10 pmol/µl), 1,2 µl Taq polimerázt és 8 µl steril Milli-Q vizet mértünk. A PCR program beállításai: elődenaturáció 95 °C, 5 perc; (denaturáció 95 °C, 30 másodperc; primer kötődés 72 °C, 30 másodperc; lánchosszabbítás 72 °C, 30 másodperc) x 25 ciklus.

3.3.1.2. Rekombináns egyedek genotípus ellenőrzése

A térképező populáció genotípus ellenőrzése során a rekombináns egyedekről származó DNS mintát, a saját fejlesztésű markerek tesztelésére pedig a szülő egyedek DNS-ét használtuk templátként. A reakciót 12 µl végtérfogatban folytattuk le hagyományos Taq polimeráz segítségével. A reakcióhoz mintánként 1 µl templát DNS-t (~50 ng/µl), 1,2 µl DreamTaq 10x puffert, 0,3 µl dNTP-t (10mM), 1-1 µl primert (10 pmol/µl), 1,2 µl Taq polimerázt és 7 µl steril Milli-Q vizet mértünk. A PCR program beállításai: elődenaturáció 95 °C, 5 perc; (denaturáció 95 °C, 30 másodperc; primer kötődés 72 °C, 30 másodperc; lánchosszabbítás 72 °C, 20 másodperc) x 35 ciklus.

3.3.1.3. Génjelöltek amplifikációja

A génjelöltek amplifikációjához a Takara cég által forgalmazott CloneAmp™ HiFi polimeráz enzimet alkalmaztuk, mely egy rendkívül gyors és pontos átírást biztosító „hot-start” polimeráz. A reakciót a gyártó útmutatása alapján állítottuk össze.

A NBLR1-es gén amplifikálásához a rezisztens szülő genomi DNS mintáját használtuk templátként. A reakciót 25 µl végtérfogatba állítottuk össze. A reakcióhoz mintánként 12,5 µl CloneAmp premixet (puffer és polimeráz), 1 µl DNS templátot (~50 ng/µl), 1-1 µl primer párt és 9,5 µl MilliQ vizet mértünk. A PCR program beállításai: elődenaturáció 95 °C, 5perc (denaturáció 98 °C 10 másodperc; primer kötődés 60 °C, 10 másodperc; lánchosszabbítás 72 °C, 1 perc 35másodperc) x 35 ciklus.

A TF1-es génjelölt klónozásához a rezisztens szülő RNS mintáiból írt cDNS-t használtuk templátként. A reakció összetétele megegyezett a NBLR1-es gén amplifikálásához használt reakcióval a templát kivételével. A PCR program beállításai: elődenaturáció 95 °C,

5perc (denaturáció 98 °C, 10 másodperc; primer kötődés 60 °C, 10 másodperc; láncosszabítás 72 °C, 20 másodperc) x 35 ciklus.

3.3.2. Gélelektroforézis

A PCR reakciókat agaróz gélelektroforézis segítségével értékeltük. A minták futtatásához 1 %-os agaróz gélt használtuk melyet 1X-es TAE pufferben oldottunk fel és 140 V feszültségen futtattuk. A térképezéshez használt markerek esetében gyakran töményebb agaróz használata szükséges, így ilyen célra 1,5 esetleg 2 %-os agaróz gélt használtunk. A DNS mintákat etídium-bromid segítségével festettük meg és a minták felviteléhez 6x Loading Dye (Thermo Fischer) festéket használtunk. A géleket a GeneGenius (SynGene) készülékben vizsgáltuk GeneSnap szoftver használatával.

3.4.A génjelöltek klónozása

3.4.1. Táptalajok

3.4.1.1. Baktérium táptalajok

LB: Az *E. coli* és agrobaktérium felszaporításához szilárd és folyékony LB (Luria-Bertani) táptalajt használtunk. Az *E. coli* baktériumhoz használt táptalajokhoz 100 mg/l spektinomycin antibiotikumot, míg az agrobaktérium felszaporításához használt táptalajokhoz 30 mg/l rifampicin és 100 mg/l spektinomycin antibiotikumot adtunk (1. Melléklet).

3.4.1.2. Növény táptalajok

MS20: A steril magvetés és a transzformáció során antibiotikummentes MS20 táptalajt használtunk (2. Melléklet).

MPGY: A kokultivációt követően a növényeket paprika gyökereztető MS táptalajra helyeztük, melyhez 400 mg/l cefatoximot, 60 mg/l kanamicint és 0,5 mg/l Indol-ecetsavat adtunk (3. Melléklet).

3.4.2. Génjelöltek izolálása a klónozáshoz

A két génjelölt izolálására két különböző módszert alkalmaztunk. A NBLR1-es génjelöltet genomi DNS-ből izoláltuk. Erre azért volt lehetőségünk mert ennek az NBS-LRR génnek a nyílt leolvasási kerete egy exonból áll. A genomi DNS-t a rezisztens szülőfajtából amplifikáltuk fel, olyan specifikus primerpárral, melyek tartalmazzák a Gateway-BP reakcióhoz szükséges attenuációs (*att*) kötőhelyeket. A TF1-es génjelöltet cDNS-ből amplifikáltuk fel, mivel a gén négy exont tartalmaz, így a genomi DNS-ből amplifikált a fragment mérete meghaladná a 7000 bázispárt, ami meglehetősen megnehezítené a klónozást.

Ezt a gént kétféle formában klónoztuk expressziós vektorba. Használtuk a nyílt leolvasási keretet, amely csak a kódoló szakaszt tartalmazza, és használtuk teljes mRNS-ként, ami a kódoló szakasz mellett tartalmazza az UTR régiót is. Ennek az oka, hogy szakirodalmi források alapján a transzkripció faktor ortológjainak kifejeződését kisRNS alapú szekvenciák is szabályozhatják, melyek a predikciók alapján a gén UTR régióihoz is kapcsolódhatnak.

3.4.3. A génjelöltek tisztítása PCR termékből

Annak érdekében, hogy az izolált fragmentum mellől eltávolítsuk a reakcióból hátra maradt szennyező anyagokat (pl.: sók, enzim maradványok, primer dimerek) a mintákat PCR tisztító kit segítségével tisztítottuk. A tisztításhoz a QIAGEN cég QIAquick PCR Purification Kit-jét használtuk a gyártó által megadott instrukciók alapján. A PCR tisztító kit egy szilika membránt tartalmazó oszlopon megköti a DNS-t, míg a 60 bp alatti szekvenciák és egyéb anyagok, alkoholos mosást követően az oszlopon átfolyva távoznak. A protokoll 2-es (DNS membránra kötése) és 5-ös (eluálás) lépését kétszer végeztük el az átfolyt eleggyel, a nagyobb töménység elérésének érdekében. A tisztítás, után a termék tisztaságát és töménységét Nanodrop (Thermo Scientific) készülék segítségével ellenőriztük, majd a mintákat -20 °C -on tároltuk a következő munkafázis megkezdéséig.

3.5. Gateway klónozás

Az 1990-es évek végén az Invitrogen cég kifejlesztett egy saját restriktációs hasítás nélküli technológiát. Ez a klónozási rendszer a lambda fág helyspecifikus rekombinációjának elvén alapszik, ahol a DNS szakasz beépüléséért rövid, specifikus bázissorrendű szakaszok felelnek. Ilyen szakaszok például a lambda-fág *attP* és baktérium *attB* (attachment site) régiói. A gateway rendszerben a bakteriofág életciklusát használjuk ki: amikor a fág lizogén állapotba kerül egy specifikus integrációs enzim irányítja a fág gazdakromoszómába való integrációját. Az enzim a fág cirkuláris DNS-ét, egy adott helyen (*attP*) felnyitja, és egyesíti a baktériális genom egy specifikus helyével (*attB*). Az *attP* és *attB* szekvenciák összekapcsolódásával hibrid szekvenciák keletkeznek, méghozzá *attL* és *attR*. (Zeke, 2013). A rekombináció létrejöttéhez két főkomponens szükséges: a DNS rekombinációs szekvenciák (*att* helyek), valamint az enzim (klonáz) amely a rekombinációs eseményt segíti.

A klónozás során speciális *attB* kötőhellyel rendelkező primerpárral amplifikáljuk a klónozni kívánt fragmentumot. Az így izolált és felszaporított fragmentumunk tartalmazni fogja a recipiens donor vektorral kompatibilis *att* kötőhelyeket és a rekombinációt követően létrejön az entry klón (BP reakció), amelyen a beépült fragmentumunk két végén a rekombináció hatására hibrid *att* kötőhelyek jönnek létre. Ezt követően az entry klón és a recipiens destination

vektor kombinálásával kapjuk meg a transzformációhoz használt expressziós vektort (LR reakció). A rendszer legfőbb előnye, hogy nagyon rugalmas, mivel az *att* kötőhelyeknek köszönhetően emésztés és ligálás nélkül át lehet helyezni a klónozott DNS fragmentumokat eltérő kutatási célt szolgáló expressziós vektorokba. A Gateway módszer további előnye, hogy a donor és destination vektoron jelen van egy *ccDB* gén is, amely a legtöbb *E. coli* törzsre nézve letális, így a baktérium transzformáció után csak olyan telepek képesek felszapordni, melyekben végbement a rekombináció. A *ccDB* gén jelenléte miatt az üres donor és destination vektorok fenntartásához DB3.1 *E. coli* törzset kellett használnunk.

Az általunk használt pDONR™ 221 vektor tartalmaz egy spektinomycin rezisztencia gént a szelekcióra, valamint az *attP1* és *attP2* szekvenciák által határolt *ccDB* gént (4. Melléklet).

A transzformációhoz használt PK7WG2D expressziós vektor tartalmaz egy spektinomycin rezisztencia gént a baktérium szelekcióhoz, egy kanamicin rezisztencia gént a növény szelekcióhoz, egy GFP gént melyet *rolD* promóter hajt a transzformáció detektálásához, és a saját génjelöltünket tartalmazó kazettát 35S promóter által hajtva (5. Melléklet).

3.5.1. BP reakció

A BP reakció során a klónozni kívánt fragmentum és a donor vektor között megy végbe reakció, melynek végén megkapjuk az LR reakcióhoz szükséges entry klónt. Az entry klón előállításához a megfelelő *attB* felismerőhelyeket tartalmazó primer párral amplifikált, majd tisztított fragmentumokat, és a pDONR™ 221 donor vektort használtuk. A reakció során, ha sikeresen végbe megy a rekombináció a klónozni kívánt fragmentum beépül a donor vektorba, miközben az amplifikált PCR termék *attB* és a donor vektor *attP* szekvenciáinak összekapcsolódásával *attL* hibrid szekvenciák keletkeznek. A reakciót 10 µl végtérfogatba állítottuk össze a gyártó utasításai alapján. A reakcióhoz 150 ng PCR terméket és donor vektort mértünk, majd 8 µl-re töltöttük fel TE puffer (Tris-EDTA, 1:1, pH: 8.0) hozzáadásával. A kapott elegyhez vortexelés után 2 µl BP Clonase™ II enzimet mértünk, majd ismét vortexeltük az elegyet. Az enzimet folyamatosan jégen tartottuk, majd használat után egyből visszatettük -80 °C-ra, nagy hőérzékenysége miatt. A reakciót 18 órát inkubáltuk 25 °C-on. A 18 óra leteltével, a reakciót 1 µl Proteinase K oldat hozzáadásával állítottuk le, majd PCR gépben inkubáltuk 10 percig 37 °C-on. A reakcióelegyet DH5α kompetens *E. coli*-ba transzformáltuk. A kolóniákat PCR-rel és szekvenálással ellenőriztük. A szekvenálás során megbizonyosodtunk arról, hogy az entry klónunk tartalmazza a klónozni kívánt fragmentumot, és az *att*-helyek

szekvenciáján nem történt mutáció. Az ellenőrzések után a pozitív telepekből plazmidot izoláltunk (3.5.4.), mely végén megkaptuk az entry klónokat.

3.5.2. LR reakció

Az LR reakció során a BP reakció alkalmával összeállított entry klón és a célvektor között megy végbe a rekombináció. A reakció eredményeképp sikeres rekombináció esetében létrejön a kívánt expressziós vektorunk, mely tartalmazza a klónozott fragmentumunkat a rekombinálódott *att*-helyekkel határolva. Az LR reakció során az entry klónon lévő *attL* és a destination vektoron található *attR* helyek *attB* helyet generálnak. A reakciót 10 µl végtérfogatba állítottuk össze a gyártó utasításai alapján. A reakcióhoz 150 ng entry klónt és destination vektort mértünk, majd 8 µl-re töltöttük fel TE puffer (Tris-EDTA, 1:1, pH: 8.0) hozzáadásával. A kapott elegyhez vortexelés után 2 µl BP Clonase™ II enzimet mértünk, majd ismét vortexeltük az elegyet. Az enzimet folyamatosan jégen tartottuk, majd használat után egyből visszatettük -80 °C-ra, nagy hőérzékenysége miatt. A reakciót 18 órát inkubáltuk 25 °C-on. A 18 óra leteltével, a reakciót 1 µl Proteinase K oldat hozzáadásával állítottuk le, majd PCR gépben inkubáltuk 10 percig 37 °C-on. A reakcióelegyet DH5α kompetens *E. coli*-ba transzformáltuk. A kolóniákat PCR-rel ellenőriztük. A pozitív telepekből plazmidot izoláltunk a 3.5.4-es fejezetben leírtak alapján, aminek végeredményeként megkaptuk az expressziós vektort, melyekből agrobaktérium transzformációt indítottunk.

3.5.3. Konstrukció transzformálása *E. coli*-ba

A reakcióban sikeresen létrejött expressziós vektorunk felszaporításához az *Escherichia Coli* baktérium DH5α törzsét használtuk. 100 µl kompetens sejtet összemértünk 10 µl BP vagy LR reakcióeleggyel majd 20 percig inkubáltuk jégen. Az inkubációt követően a baktériumsejteket hősokknak vetettük alá 42 °C-os vízfürdőben 45-50 másodpercig, majd ezt követően egyből jégre tettük. A hőmérséklet hatására, a kompetens sejtek felveszik a plazmidokat, melyekből csak a rekombinánsak tudnak felnőni. A hősokk után a csőbe steril fülke alatt belemértünk 900 µl folyékony LB steril táptalajt, és másfél órán keresztül növesztettük, 37 °C-on rázóinkubátorban (Sanyo) 200 rpm-en. Ezalatt az idő alatt a baktérium el tudja kezdeni rezisztenciagénjeinek expresszióját. A rázatást követően a tápoldatban lévő sejteket 2000 RPM-en 10 percig centrifugáltuk. A felülúszóból 800 µl-t lepipettáztunk és 100 µl transzformált sejtuszpenziót antibiotikum tartalmú szelektív LB táptalajra szélesztettünk steril üveggolyók segítségével, majd 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk termosztátban (Heraeus). Transzformáció után, a pozitív telepekből mindig glicerines törzsoldatot

készítettünk, amit 850 µl overnight növesztett sejtszuszpenzió és 350 µl 87 %-os glicerinnel összekeverésével állítottunk elő.

3.5.4. Plazmid izolálás

A plazmidok izolálásához a pozitív baktérium kolóniákból folyékony tenyészetet indítottunk, melyeket overnight növesztettük 37 °C -on 200 RPM-en rázatva (Sanyo). A folyékony tenyészethez a felnőtt baktériumokat pipetta hegyével leszedtük a táptalajról majd 4 ml megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB táptalajba helyeztük őket. A felnőtt tenyészetekből 2 ml-es eppendorf csőbe öntöttük (2-szer) a szuszpenziót, majd 13000 RPM-en 3 percig centrifugáltuk. A felülúszó táptalaj leöntése után a baktérium pelletből az Agilent cég StrataPrep Plasmid Miniprep Kit segítségével izoláltunk plazmidokat, a gyártó instrukcióit követve. Az izolált plazmidokat 35 µl végtérfogatba oldottuk vissza és -20 °C-on tároltuk őket. A minták tisztaságát és töménységét Nanodrop készülék segítségével mértük, majd szekvenálásra küldtük az izolált plazmidokat.

3.6. Génbevitel transzformációval

3.6.1. Kompetens agrobaktérium készítése

A transzformációhoz használt ARqual *Agrobacterium rhizogenes* törzset a Növénygenomikai és Növény-Mikróba Interakció Csoport munkatársai bocsátották rendelkezésünkre. A kapott törzsből saját törzset, valamint az expressziós vektorunk befogadásához szükséges kompetens sejteket készítettünk. A rifampicin tartalmú táptalajon felnőtt telepekből folyékony overnight tenyészetet indítottunk 30 °C-fokon 200 RPM rázás mellett. A felnőtt tenyészetből 2 ml szuszpenziót 50 ml folyékony friss LB táptalajba pipettáztunk, majd 5-6 órán át növesztettük 30 °C-on amíg az OD₆₀₀ értéke 0,5 és 1 közé esett. A sejtszuszpenziót lehűtöttük majd 5 percig centrifugáltuk 4 °C-ra hűtött centrifugában 3000 g erővel. Innentől kezdve folyton jégen tartottuk a szuszpenziót. A felülúszó táptalajt leöntöttük a baktérium pelletről majd 20 ml 20mM töménységű CaCl₂ oldatban reszuszpendáltuk a baktériumokat. A folyadékot 4000 g erővel centrifugáltuk 10 percen keresztül hűtött centrifugában majd a felülúszó oldatot eltávolítottuk a csőből. A baktérium pelletet 1 ml 20mM töménységű CaCl₂ oldat hozzáadásával oldottuk vissza, és a szuszpenzióból 100 µl mennyiséget mértünk ki összesen 10 darab eppendorf csőbe. A kimért csövekhez 30 µl 87 %-os glicerint mértünk, majd -80 °C-os hűtőben tároltuk őket a transzformáció megkezdéséig.

3.6.2. Agrobaktérium transzformáció

Expressziós vektorunk *A. rhizogenes*-be történő bejuttatására az úgynevezett „Freeze-thaw” protokollt használtuk. A kompetens agrobaktérium sejtekhez 1 µg ellenőrzött expressziós vektort mértünk. A csöveket ezután folyékony nitrogénben fagyasztottuk pár percig. A fagyasztást követően 37 °C-os vízfürdőbe tettük őket 12 percre. A hőmérséklet változásainak hatására, a kompetens sejtek felveszik a plazmidot. A vízfürdőt követően 1 ml folyékony LB steril tápoldatot mértünk az eppendorf csőbe, majd két órán keresztül növesztettük a baktériumokat 30 °C-on rázóinkubátorban (Gallenkamp), mely idő alatt aktiválódnak a baktérium antibiotikum rezisztencia génjei. A két óra elteltével a csöveket centrifugáltuk (3000 RPM-en 5 percig). A felülúszóból 900 µl-t lepipettáztunk és a maradék folyadékot felszuszpendáltuk. 100 µl transzformált sejtsuszpenziót antibiotikum tartalmú szelektív LB táptalajra szélesztettünk steril üveggolyók segítségével. A felnőtt telepeket kolónia PCR segítségével ellenőriztük, majd a pozitív telepekből az *E. coli* transzformációnál leírtak alapján glicerines törzsoldatot készítettünk.

3.7. Növény transzformáció

3.7.1. Steril magvetés

A transzformációhoz a szenzitív szülő fajtánkat a Fehérözön paprikafajtát használtuk. A sterilizálás előtt a transzformációhoz használt növények magjait steril Milli-Q vízben áztattuk 3 órán keresztül a magasabb csírázási százalék érdekében. A sterilizálást 10 %-os kalcium-hipokloritos oldatban végeztünk 20 percig 120 RPM-es rázítás mellett PSU-20i (Biosan) rázógépen. A sterilizáló oldathoz 3 csepp Tween20-at is adtunk a sterilizálás hatékonyságának növelése érdekében. A sterilizálást követően a magokat háromszor mostuk steril Milli-Q vízben, majd MS20 táptalajra helyeztük őket. A sterilizálást és a magvetést végig sterilfülke alatt végeztük.

3.7.2. *A. Rhizogenes* fertőzés

A transzformációhoz szükséges agrobaktérium törzsből 50 µl sejtsuszpenziót szélesztettünk antibiotikum tartalmú szilárd LB táptalajra steril üveggolyók segítségével. A kontroll növények transzformációjához az expressziós klón előállításához használt destination vektort használtuk kandidáns gjenjelöltjeink nélkül, üres állapotban. A baktériumokat két napig növesztettük 30 °C-on termosztátban (Heraeus). Két nap után a táptalajon egybefüggő agrobaktérium gyp keletkezett.

A paprika növények fertőzését steril wolfram tű segítségével végeztük. Többféle módszert is alkalmazhatunk, viszont a csoport korábbi kutatásai során a wolfram tűvel történő fertőzés mutatta a legnagyobb hatékonyságot, mivel a vékony, sima felszínű tű a lehető legkisebb sebzési felületet ejti a növényen. A szikleveles állapotban lévő növények gyökerét steril szikével leválasztottuk a hipokotil alatt (4. ábra).



4. ábra: Szikleveles növény a gyökér leválasztása után

A transzformációhoz a növények hipokotilját fertőztük. A wolfram tűt finoman megforgattuk a baktériumgyepecben majd a növények hipokotiljának alsó felét vertikálisan megszártuk 5-6 ponton (5. ábra).



5. ábra: A hipokotil fertőzése

A módszer esetében különösen figyelni kell a használt baktérium mennyiségére, hiszen túl kevés baktérium esetében mozaikos, vagy elégtelen expressziót lehet tapasztalni, míg túl sok baktérium használata túlzott baktériumnövekedéssel ezáltal a növény pusztulásával járhat. A sebzés hatására a baktérium bejut a növénybe és serkenti a növény hajszálgökér képzését, ami az említett „Hairy root” fenotípus kialakulásához vezet. A hairy root fenotípus egyfajta vizuális indikátornak is számít a fertőzés sikerességéről, azonban a fenotípus kialakulásához nem szükséges a konstrukciós-kazettánk bejutása, így elengedhetetlen a gyökereket fluoreszcens mikroszkóp alatt is megvizsgálni, hogy tényleges képet kapjunk a transzformáció sikerességéről. A fertőzött növényeket antibiotikummentes MS20 táptalajt tartalmazó steril üveg tenyésztőcsövekbe helyeztük. A 24mm átmérőjű és 15cm magasságú tenyésztőcsövekbe nagyjából 12 ml táptalaj került és a növények individuálisan lettek a csövekbe ültetve (6. ábra).



6. ábra: Fertőzött növény a steril tenyésztőcsőben

A fertőzést eddig két konstrukcióval tudtuk elvégezni a PK7WG2DNBLR1-el és a PK7WG2DTF1CDS-el. A PK7WG2DTF1CDS konstrukció esetében eddig 110 darab növényt sikerült fertőznünk melyből 20 darab kontroll növény volt. A PK7WG2DNBLR1 fertőzését 60 darab növényen sikerült lefolytatni melyből 15 darab kontroll növény volt.

A fertőzött növényeket ezután fényszobában 4 napig tenyésztettük együtt a baktériummal. A kokultivációt követően a növényeket paprika gyökereztető táptalajra helyeztük. Az átrakás során a növényeket 500 mg/l cefaximot tartalmazó steril vízben mostuk az új táptalajra helyezés előtt. Egyszerre tíz növényt helyeztünk a vízbe, ahonnan egyesével helyeztük őket a gyökereztető táptalajra, ezáltal több növényt tudunk egyszerre kezelni, a dehidratáció veszélye nélkül. A növényeket két hetente új gyökereztető táptalajra transzplantáltuk a folytonos antibiotikum és hormon ellátás érdekében. Az expressziós vektoron található kanamicin rezisztencia gén a növény gyökereire gyakorol szelekciós nyomást

(transzformáns gyökerek promótálása), míg a cefatoxim a növény számára veszélytelen, azonban megakadályozza a baktérium növekedését. Mivel az első átrakás alkalmával nem érzékeltünk baktériumnövekedést, így a további transzplantációk alkalmával a növényeket cefatoxim nélküli steril vízben tartottuk az átrakás folyamata alatt.

3.8. Transzformáns növények detektálása

3.8.1. Transzformáció sikerességének ellenőrzése

3.8.1.1. Génexpresszió kimutatása molekuláris szinten

A sikeres transzformációt követően a növényeket gyökérgubacs fonálféreggel fertőzzük, annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a génjelöltek rezisztenciában betöltött szerepét. A gyökérgubacs fonálféreg fertőzést követően a növények gyökereit poolozva fogjuk leszedni. A poolozott gyökerekből először RNS-t izolálunk, majd cDNS-é írjuk őket, hogy molekuláris szinten is igazolni tudjuk a génjelöltjeink expresszióját. Mivel a növények transzformációja még folyamatban van, a génjelöltek expressziójának molekuláris kimutatására még nincs lehetőségünk.

3.8.1.2. GFP

A riportergének olyan speciális enzimfehérjéket kódolnak, melyek működése lehetővé teszi annak vizualizációját. A riportergének a transzformáció sikerességéről, vagy a számunkra értékes génnel összekapcsolva, annak expressziójáról és lokalizációjáról adnak információt. Az általunk használt vektor konstrukciókban a GFP riportergént alkalmaztuk. A GFP gén egy zöld fluoreszcens fehérjét kódol, mely UV-fényben zölden fluoreszkál. A kontroll növények transzformációjához használt üres vektorok esetében, a GFP gén saját génjelöltünk nélkül kerül a növénybe. A kontroll növények esetében ezért sikeres transzformáció esetén szintén kimutatható a GFP jel emittálása, így a riportergén a kontroll növények transzformációjának sikerességéről is információt szolgáltat. A gyökereken a GFP jelet egy Leica MZ10 F fluoreszcens sztereomikroszkóp (Leica, Wetzlar, Németország) segítségével vizsgáltuk, 480 nm hullámhosszú GFP szűrőt alkalmazva.

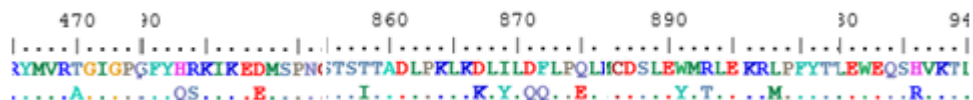
3.8.2. Fertőzés fonálféreggel, kandidáns gének fenotípusának kiértékelése

A konstrukciókba épített génjelöltek rezisztenciában betöltött szerepét a transzformált növények gyökérgubacs fonálféreg fertőzésével tervezzük vizsgálni. A fertőzéshez *Meloidogyne incognita* állománnyal fertőzött gyökérdarabokat izolálunk, melyeket homogenizátor segítségével apró darabokra zúzunk. A roncsolás hatására a gyökerekből kiszabadulnak a J2 stádiumban lévő fonálféreg. A roncsolt gyökérmintákat 50 µm-es szűrőn átfolyatjuk így csak a fonálféreg tudnak átjutni a szűrőn. A szűrt elegyen fénymikroszkóp alatt elvégezzük a jelenlévő fonálféreg számának meghatározását. A kiültetett növények tövéhez közel azonos (~500-1000 darab) J2 stádiumú fonálférget juttatunk ki. A fertőzési fenotípus kialakulásáig 2 hónapot várunk, majd a növények gyökerét kibontjuk, és rajtuk elvégezzük a gubacsok megszámlálását. A tojások megszámlálása után a növények gyökérmintáiból totál RNS kivonást készítünk.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. Génjelöltek

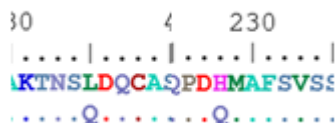
Az NBLR1 génjelölt szekvenciaelemzése során megállapítottuk, hogy a rezisztens és szenzitív szülői genomokban a gén kódoló szakaszán egy 22 bázispáros eltérés található. Az eltérések 14 aminosav cserét eredményeznek, amelyek szerepet játszhatnak a *Meloidogyne* fajokkal szembeni rezisztencia kialakításában (7. ábra).



7. ábra: Rezisztens és szenzitív szülő alléljainak aminosav eltérései az NBLR1 génjelölt esetében.

A gén a CC-NBS-LRR géncsaládba tartozik. A fehérje predikciók alapján a gén ideális jelölt lehet a rezisztenciáért felelős tulajdonság kialakításáért.

A transzkripciós faktort kódoló génjelölt kezdetben nem került látóterünkbe, mivel előzetes elképzelésünk alapján a rezisztencia forrása egy NBS-LRR családba tartozó gén lehet, hiszen a legtöbb eddig kimutatott gyökérgubacs fonálféreg rezisztencia gén ennek a családnak a képviselője. A gén a meghatározott *Me1* régióknál szélén található, a felső határoló markerünk közelében. Cabrera és munkatársai 2015-ben egy kutatás során fonálféreg rezisztenciában résztvevő gének expresszióját vizsgálták. Kutatásuk során a TF1 génünk *Arabidopsis thaliana*-ban található ortológját is vizsgálták. Eredményeikben a transzkripciós faktor mikroRNS-ek általi leszabályzását figyelték meg a fonálféreg fertőzés alatt. A gén szekvenciájának izolálása, szekvenálása és analízise során 2 aminosav cserét azonosítottunk a gén kódoló régiójában a rezisztens és szenzitív szülő alléljai között (8. ábra).



8. ábra: Rezisztens és szenzitív szülő alléljainak aminosav eltérései a TF1 génjelölt esetében.

A fent említett cikk adatait alapul véve, a gén teljes mRNS szekvenciáját is konstrukcióként használtuk, mivel a kutatásban predikált kisRNS szekvenciák egy része a gén UTR régióit célozta. A TF1 mRNS konstrukció a munkafolyamatok során felmerülő nehézségek miatt még a klónozás fázisában tart.

4.2. Oligók tervezése a klónozáshoz

A génjelöltek amplifikálásához és klónozásához speciálisan a Gateway technológiához tervezett primerpárt használtunk. A génekre tervezett forward primerek az *attB1* szekvenciával indulnak 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3' és a gén start kodonjára tapadnak ki egy 23 bp-os szakaszra. A szükséges reverz primerek tervezésénél az oligo szekvencia az *attB2* szekvenciával indult 3'-ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC-5' és a gén stop kodonjára tapadt ki egy 23 bp hosszú szakaszra. Az *attB1* és *attB2* helyek miatt rekombináció után a génünk csak egy orientációban épülhet be a klónozott vektorba. A génjelölteket, valamint térképezéshez és klónozáshoz használt DNS szekvenciákat a kutatással kapcsolatos esetleges kompetíciók és titoktartás miatt nem tüntettük fel a diplomamunkában. Az említett okok miatt a génjelöltek nevei is saját azonosítóval lettek ellátva.

4.3. A régió további szűkítése molekuláris módszerekkel

A célzott régióink további szűkítéséhez a 326-os számú rekombináns F2 egyedből származó F3 öntermékenyített magokból 60 darabot vettünk el. Az ismert *Me1* régióinkra a szenzitív és rezisztens szekvenciát felhasználva újabb kodomináns molekuláris markereket terveztünk annak reményében, hogy tovább szűkítsük a kromoszómális régióinkat. A növények tesztelése során, nem találtunk megfelelő utódot, ami feltehetőleg annak köszönhető, hogy vizsgált régióink már meglehetősen szűk ezért rekombinációs események ritkábban fordulnak elő. A markerek tervezésénél komoly gátat jelent régióink repetitív jellege, ezért a legtöbb újonnan tervezett markerünk legalább két lokuszról amplifikált.

4.4. Klónozás

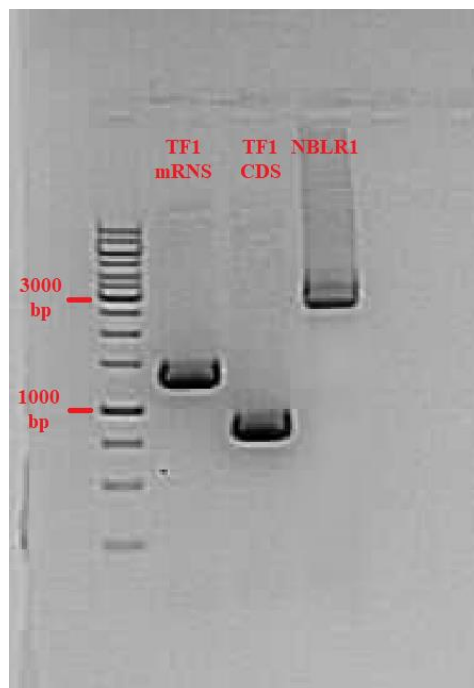
4.4.1. Génjelöltek amplifikációja és izolálása

A két génjelölt klónozásához először amplifikáltuk és izoláltuk a gének fragmentumait a szükséges *attB* helyekkel, majd kitisztítottuk őket kit segítségével. Mivel a primerek előzetes tesztelése során a fragmentumokat sikerült tisztán amplifikálnunk, ezért tisztításhoz PCR terméket használtuk. Az agaróz gélen 2 µl mintát futtatunk meg ellenőrzésre. A reakció maradékát a QIAGEN PCR tisztító kit segítségével tisztítottuk.

Az NBLR1-es génjelöltet genomi DNS-ből amplifikáltuk és egy 2838 bp méretű fragmentumot vártunk (9. ábra).

Predikcióink szerint a TF1-es génjelölt nyílt leolvasási keretének és teljes mRNS-ének mérete között 546 bp különbség van. A csak kódoló szekvenciát tartalmazó konstrukció

esetében egy 766 bp hosszúságú fragmentumot vártuk, míg a teljes mRNS esetében 1312 bp méretű PCR termékre számítottunk (9. ábra).

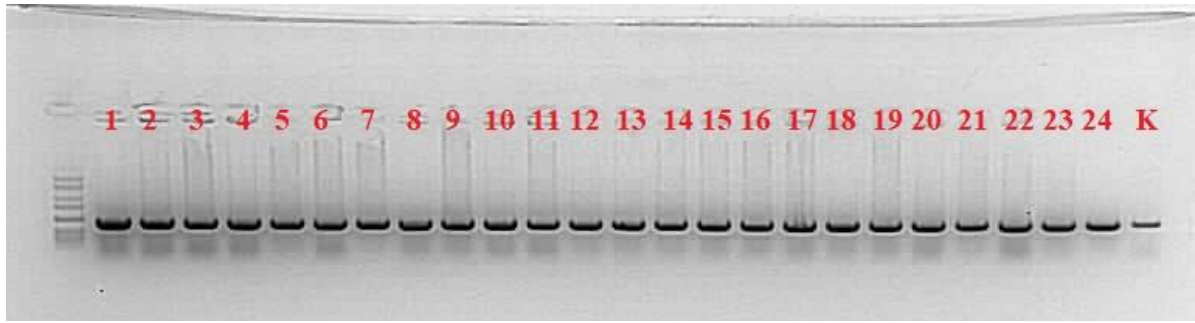


9. ábra: Génjelöltek amplifikációja (1 %-os Et. Br. festett agaróz gélen, Generuler 1kb molekuláris létra)

4.4.2. BP reakció

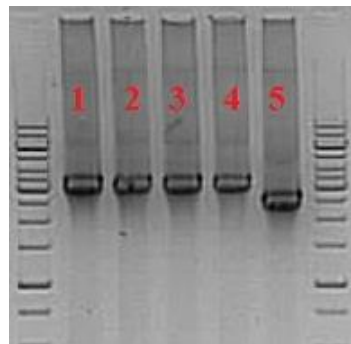
A Gateway reakció során a vektorokon jelenlévő *ccDB* gén miatt elméletben csak a transzformált és rekombinálódott sejtek képesek felnőni a táptalajon. A reakció során azonban megtörténhet, hogy a *ccDB* gén kiesik a fragmentum beépülése nélkül, ezáltal a táptalajon olyan telepek is fel nőhetnek, melyek nem tartalmazzák a számunkra értékes fragmentumot tartalmazó plazmidokat. A rekombináció során előfordulhat az attenuációs helyek mutációja is, ami megakadályozza az LR reakció sikeres végbemenetelét. Az említett okokból kifolyólag elengedhetetlen a baktérium telepek és plazmidok ellenőrzése PCR-rel és szekvenálással is.

Az NBLR1-es génjelölt esetében összesen 24 darab telepet választottunk ki kolónia PCR-rel való ellenőrzésre, melyből mindegyik telep pozitív eredményt mutatott a reakció alapján (10. ábra).



10. ábra: A BP reakció kolónia PCR eredménye az NBLR1 génjelölt esetében (1 %-os Et. Br. festett agaróz gélen.)

A TF1CDS konstrukció esetében összesen 5 darab telepet kaptunk, melyből 4 pozitív eredményt mutatott a PCR ellenőrzés során (11. ábra).



11. ábra: A BP reakció kolónia PCR eredménye a TF1CDS konstrukció esetében (1 %-os Et. Br. festett agaróz gélen.)

A TF1mRNS konstrukció baktérium transzformációja után mindössze 4 telepet kaptunk, melyekből mindegyik pozitív volt PCR ellenőrzés alapján (12. ábra).



12. ábra: BP reakció kolónia PCR eredménye a TR1mRNS konstrukció esetében (1 %-os Et. Br. festett agaróz gélen)

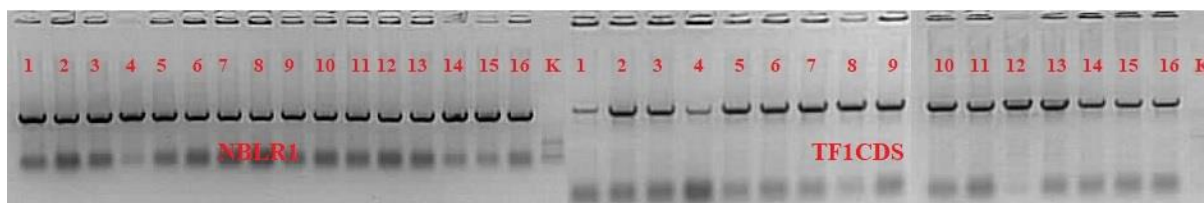
A pozitív telepek mindegyikét leoltottuk folyékony táptalajba plazmid izolálás céljából. Az izolált plazmidok szekvenciáját a szekvenálás után DNA STAR Seqman, Chromas, és Multalin szoftverekkel ellenőriztük. A szekvenálás alapján meggyőződünk arról, hogy a fragmentum beépült a vektorba és az attenuációs helyek teljesen intaktak. Azok a donor vektorok melyeken az attenuációs hely teljesen intakt és tartalmazza a klónozni kívánt

szekvenciánkat is, sikeresen létrehozott „entry clone”-oknak számítanak. Egy-egy ellenőrzött entry clone felhasználásával *E. coli* törzset és LR reakciót indítottunk.

A TF1mRNS konstrukció esetében eddig nem sikerült az LR reakciót lefolytatnunk, mivel az elvégzett hat reakció esetében egyszer sem kaptunk telepeket. Mivel a szekvenálás alapján az izolált entry clone-okban az *att* helyek sértetlenek és génkonstrukciónk is jelen van, így az LR reakció eddigi sikertelensége mögött feltehetően az UTR régiókon található szekvenciák konformációs sajátosságai játszanak szerepet.

4.4.3. LR reakció

Az NBLR1 és TF1CDS konstrukciók LR reakciói után, a transzformációt követően 16-16 telepet választottunk ki ellenőrzésre (13. ábra).



13. ábra: Az LR reakció kolónia PCR eredménye (1 %-os Et. Br. festett agaróz gélen).

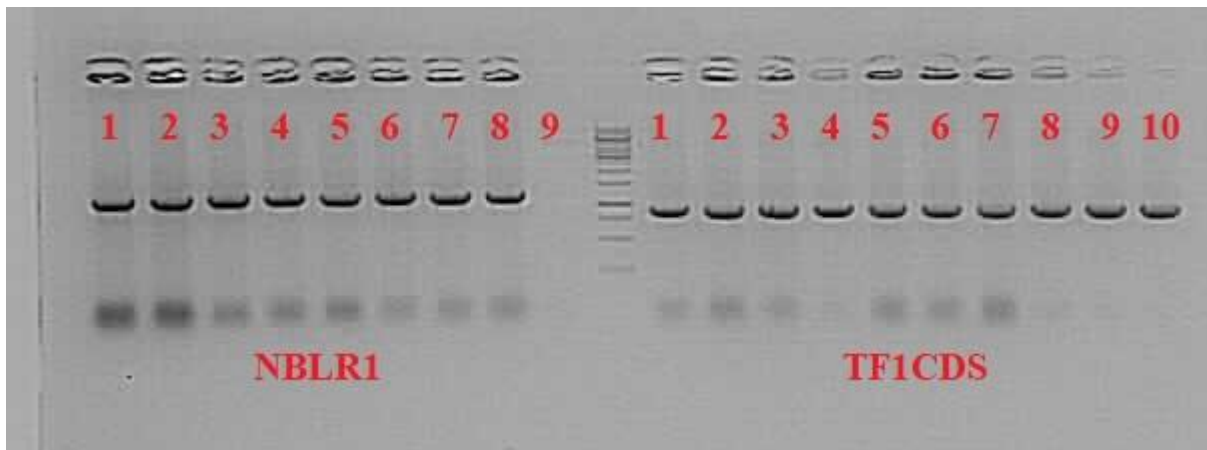
A kolónia PCR eredményei alapján a kiválasztott telepek közül mindegyik pozitívnak bizonyult mindkét génjelölt esetében, ezért 10-10 darabot leoltottunk folyékony tenyészetbe plazmid izoláláshoz. Az izolált plazmidok szekvenciáját a szekvenálás után DNA STAR Seqman, Chromas, és Multalin szoftverekkel ellenőriztük. A szekvenálás alapján meggyőződünk arról, hogy a fragmentum beépült a vektorba és az attenuációs helyek teljesen intaktak. Azok a destination vektorok melyeken az attenuációs hely teljesen intakt és tartalmazza a klónozni kívánt szekvenciánkat is, sikeresen létrehozott expressziós vektornak számítanak. Az expressziós vektorok közül kiválasztottunk egyet, majd *E. coli* törzset és agrobaktérium transzformációt indítottunk vele.

4.4.4. Agrobaktérium transzformáció

Az LR reakció eredményeként kapott expressziós vektorokat folyékony nitrogén segítségével („Freeze-thaw”) juttattuk be a kompetens *A. rhizogenes* sejtekbe. A transzformáció sikerességét kolónia PCR-rel ellenőriztük.

Az NBLR1-es génjelölt esetében 9 telepet, a TF1CDS-es génjelölnél pedig 10 darab telepet kaptunk, ezek mindegyikét ellenőriztük kolónia PCR alkalmazásával.

A PCR eredményei alapján a kiválasztott telepek közül a TF1CDS esetében mindegyik pozitívnak bizonyult, míg az NBLR1 esetében 8 lett pozitív (14. ábra).



14. ábra: Az *A. Rhizogenes* transzformáció kolónia PCR eredménye.

A pozitívnak bizonyult agrobaktérium telepekből kiválasztottunk konstrukciónként 6 darabot plazmid izolálás céljából. Az izolált plazmidok szekvenciáját a szekvenálás után DNA STAR Seqman, Chromas, és Multalin szoftverekkel ellenőriztük. A génjelöltjeinket tartalmazó plazmidok közül kiválasztottunk konstrukciónként egyet, mellyel újra elvégeztük a transzformációt, majd folyékony agrobaktérium törzset készítettünk belőle a későbbi növény transzformációkhoz.

4.5. Növény transzformáció

A növények transzformációját két szakaszra bontva indítottuk el, a könnyebb kezelés érdekében. Elsőként a PK7WG2DNBLR1-es konstrukcióval fertőztünk. A fertőzést 60 darab növényen sikerült elvégeznünk, melyből 15 darab kontroll növény volt. A második körben a PK7WG2DTF1CDS konstrukcióval fertőztünk egy hét csúszással az első konstrukcióval történt fertőzéshez képes, ezért a további átrakások egymást követő hetekre estek. A fertőzést ebben az esetben 110 növényen sikerült elvégeznünk melyből 20 darab kontroll növény volt.

A növények egy-másfél hét elteltével érték el a transzformációhoz szükséges állapotot. A szikleveles növények túl nagy sebzése, a növény pusztulásához vezethet, ezért a fertőzés során ügyelni kellett a pontos sebzési felület kialakítására. A sebzett növényi részeken enyhe sejtnekrózis és sejtburjánzás volt megfigyelhető. A friss gyökérhajtások fokozottan sérülékenyek, így az átrakások során ügyelni kellett a növények óvatos kezelésére a gyökerek kialakulásától.

A csoport előzetes kísérletei alapján előfordult, hogy az agrobaktérium túlszaporodott a tenyésztőcsövekben, ezért minden alkalommal szükség volt 500 mg/l cefatoxim tartalmú vizes mosásra a baktérium elölésének érdekében. Esetünkben már az első átrakás során sikerült előlni a baktériumot, így a későbbi átrakások során antibiotikummentes steril vízben tároltuk a növényeket. A növények a második gyökereztető táptalajra történő átrakás időpontjában

kezdték gyökerezni. Az első körben indított PK7WG2DNBLR1 konstrukció növényeit 2023.05.10-én terveztük földbe ültetni, míg a PK7WG2DTF1CDS konstrukcióval indított növények kiültetését 2023.05.17-re terveztük. Azokat a növényeket melyeknek nem sikerült gyökerezniük a kiültetés időpontjáig, továbbra is gyökereztető táptalajon tenyésztjük. A csoport előző kísérletei során a Globál paprika fajtát használta a transzformációhoz, azonban kísérletünkben a Fehérözön fajtával dolgoztunk, hogy a szenzitív szülőn tudjuk vizsgálni a génjelöltek kifejeződését. A transzformáció során azt tapasztaltuk, hogy a Fehérözön növények jóval lassabban gyökereznek az előző kísérletekben tapasztaltakhoz képest, így a kiültetés időpontját nagy valószínűséggel 1-2 héttel a tervezett időpont után tudjuk végrehajtani. A gyökerek lassú növekedése miatt, több növény még nem rendelkezett megfelelő gyökérrzel az első mikroszkópos vizsgálat során.

A két génjelölttel összesen 170 darab növény fertőzését sikerült elvégeznünk, melyből a folyamatos munkálatok során 4 darab növény pusztult el baktérium vagy gomba fertőzés következtében, mely feltehetőleg az átrakás során történt kontamináció eredménye. Így végső soron a PK7WG2DNBLR1 konstrukcióból 59 növényt tudunk vizsgálni 15 darab kontroll növényvel, míg a PK7WG2DTF1CDS konstrukció esetében 107 növényt tudunk gyökereztetni melyből 20 darab kontroll növény volt.

4.6. Expresszió kimutatása

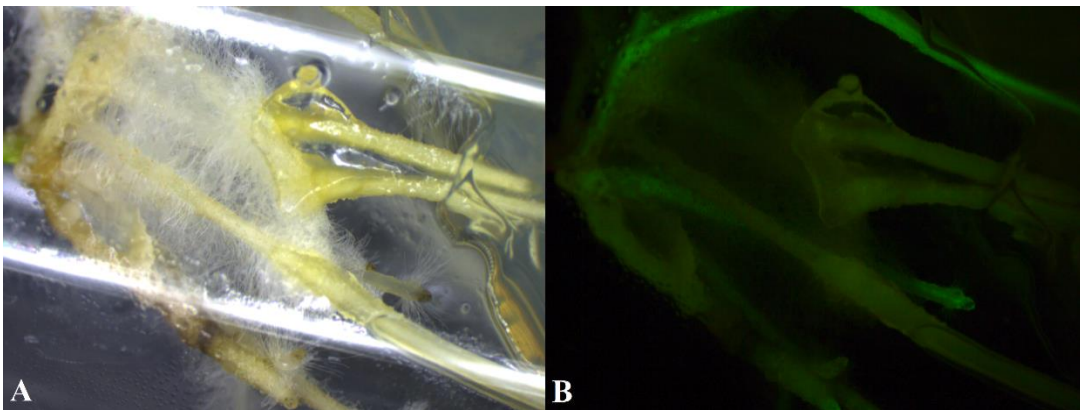
A fertőzött növényeken szabad szemmel kiértékelhető az *A. Rhizogenes* fertőzésre jellemző hairy root fenotípus kialakulása (15. ábra), azonban a csoport előzetes kísérleteinek tapasztalatai alapján előfordulhat, hogy fertőzés hatására a növényeken megjelenik a hairy root fenotípus, azonban a génkonstrukció nem épül be a növénybe, ezért elengedhetetlen a konstrukcióban működő gének expressziójának kimutatása az egyes gyökerekben mikroszkóp és molekuláris módszerek segítségével.



15. ábra: Hairy root fenotípus transzformált gyökéren

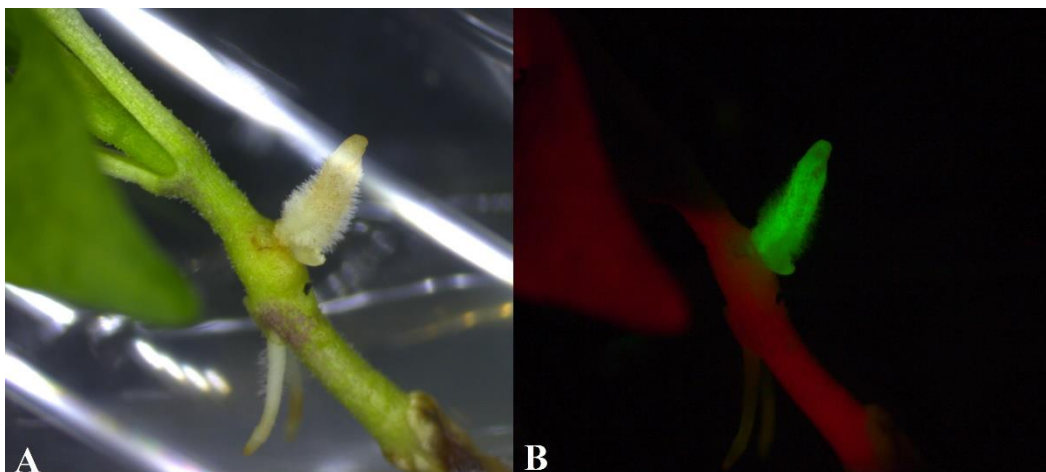
4.6.1. GFP

A GFP jel detektálását először a transzformációt követő ötödik és hatodik héten végeztük, a gyökerek megjelenésének idejében fluoreszcens mikroszkóp segítségével. A transzformáns gyökerekben a fertőzést követően alacsony és gyenge GFP expressziót tapasztaltunk az első vizsgált időpontban, mely feltehetőleg arra utal, hogy a fertőzés során az inokulált baktérium mennyisége elégtelen volt. A PK7WG2DNBLR1 konstrukció esetében vizsgált növények közül 1 darab volt pozitív (16. ábra), 39 darab negatív, és 4 darab esetében még nem indult meg megfelelően a gyökeresedés. A kontroll növények esetében a 15 növényből 5 volt pozitív. A konstrukció kiértékelését az 1. táblázat tartalmazza.

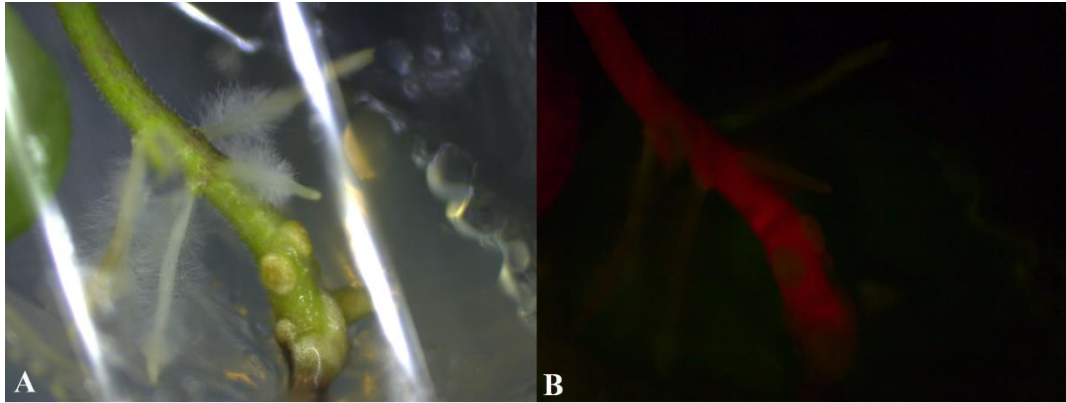


16. ábra: GFP jelet emittáló gyökérzet a PK7WG2DNBLR1 konstrukció esetében (A: normál megvilágítás, B: UV-fény megvilágítás)

A PK7WG2DTF1CDS konstrukció esetében (2. táblázat) a 87 vizsgált növényből 21 lett pozitív (17. ábra), 58 negatív (18. ábra) és 8 darab még nem tudott megfelelő gyökérzetet képezni. A kontroll növények esetében a 20 növényből 5 volt pozitív.



17. ábra: GFP jelet emittáló gyökérzet a PK7WG2DTF1CDS konstrukció esetében (A: normál megvilágítás, B: UV-fény megvilágítás)



18. ábra: Transzformálatlan gyökök autofluoreszcenciája (A: normál megvilágítás, B: UV-fény megvilágítás)

1. táblázat: A PK7WG2DNBLR1 konstrukcióval fertőzött növények mikroszkópos kiértékelésének eredménye (A fekete színnel jelölt cellák azokat a növényeket reprezentálják melyek kiértékelését még nem végeztük el, a piros színnel jelölt cellák az adott szempontra negatív, a zöld színnel jelölt cellák pedig az adott szempontra pozitív növényeket jelölik)

Azonosítók	Hairy root	GFP jel	Nem gyökerezett	Azonosítók	Hairy root	GFP jel	Nem gyökerezett
1	-	-	-	31	+	-	-
2	-	+	-	32	-	-	-
3	+	-	-	33	-	-	-
4	-	-	-	34			+
5	+	-	-	35	+	-	-
6			+	36	-	-	-
7			+	37	-	-	-
8			+	38	-	-	-
9			+	39	-	-	-
10			+	40	+	-	-
11	+	-	-	41			+
12			+	42			+
13	+	-	-	43	-	-	-
14	+	-	-	44	-	-	-
15	+	-	-	K1	+	+	-
16	-	-	-	K2	+	-	-
17	+	-	-	K3			+
18	-	-	-	K4	-	-	-
19	+	-	-	K5	+	-	-
20	+	-	-	K6	-	+	-
21	+	-	-	K7			+
22	-	-	-	K8	+	+	-
23	+	-	-	K9	-	+	-
24	-	-	-	K10	-	-	-
25	+	-	-	K11	+	+	-
26	-	-	-	K12	+	-	-
27	-	-	-	K13	+	-	-
28	+	-	-	K14			+
29	-	-	-	K15	-	-	-
30	-	-	-				

2. táblázat: A PK7WG2DTF1CDS konstrukcióval fertőzött növények mikroszkópos kiértékelésének eredménye (A fekete színnel jelölt cellák azokat a növényeket reprezentálják melyek kiértékelését még nem végeztük el, a piros színnel jelölt cellák az adott szempontra negatív a zöld színnel jelölt cellák pedig az adott szempontra pozitív növényeket jelölik)

Azonosítók	Hairy root	GFP jel	Nem gyökerezett	Azonosítók	Hairy root	GFP jel	Nem gyökerezett	Azonosítók	Hairy root	GFP jel	Nem gyökerezett
1	+	-	-	41	+	+	-	81			+
2	+	-	-	42	+	-	-	82	+	-	-
3	+	-	-	43	-	-	-	83	+	-	-
4			+	44			+	84	+	+	-
5	+	+	-	45	+	+	-	85	-	-	-
6	+	+	-	46	+	-	-	86	+	+	-
7	+	-	-	47	+	-	-	87	+	+	-
8	+	+	-	48	-	-	-	K1	+	-	-
9	+	+	-	49	+	-	-	K2			+
10	+	-	-	50	+	-	-	K3	-	-	-
11	+	-	-	51	+	-	-	K4	+	-	-
12	+	+	-	52	+	+	-	K5	+	+	-
13	+	+	-	53	+	-	-	K6			+
14	+	+	-	54	+	+	-	K7	+	+	-
15	+	-	-	55	+	-	-	K8	+	-	-
16	+	-	-	56	+	-	-	K9	+	-	-
17	+	-	-	57	+	-	-	K10	+	-	-
18	+	-	-	58	+	-	-	K11	+	+	-
19	+	+	-	59	+	-	-	K12	+	-	-
20	+	+	-	60	+	-	-	K13	+	-	-
21	-	+	-	61	+	+	-	K14	+	+	-
22	+	+	-	62	-	-	-	K15	-	-	-
23	+	-	-	63	+	-	-	K16			+
24	+	-	-	64	+	-	-	K17	-	-	-
25	+	-	-	65	-	-	-	K18	+	+	-
26	+	-	-	66	+	+	-	K19	+	-	-
27	+	-	-	67			+	K20	+	-	-
28	+	-	-	68	+	-	-				
29	+	-	-	69	+	-	-				
30	+	-	-	70	+	-	-				
31	+	-	-	71	+	-	-				
32	-	-	-	72	+	-	-				
33	+	-	-	73	+	-	-				
34	+	-	-	74	+	-	-				
35			+	75	-	-	-				
36	+	+	-	76	+	-	-				
37	+	-	-	77	+	-	-				
38	+	-	-	78			+				
39	+	-	-	79			+				
40			+	80	-	-	-				

4.6.2. Fonálféreg fertőzés és molekuláris ellenőrzés

A kiültetett növények gyökérgubacs fonálféreg fertőzését *Meloidogyne incognita* állománnyal a 2023.05.24. és 2023.05.28. közötti intervallumban terveztük elvégezni a növényeken, azonban a kísérleti eredmények alapján elképzelhető, hogy ez az időpont 1-2 héttel a tervezett időpont utánra fog esni. A gyökérgubacs fonálféreg fertőzés tüneteinek megjelenéséig mintegy másfél - két hónap szükséges cserépben történő fertőzés esetében. A fertőzést követően a gyökereken megszámláljuk a gubacsokat, valamint fluoreszcens mikroszkóp segítségével megvizsgáljuk ezen gyökerek GFP expresszióját. A GFP jelet emittáló és nem emittáló konstrukciós gyökerek, valamint a kontroll növények fertőzési fenotípusa együttesen információt szolgáltat a gén fonálféreg fertőzésben betöltött szerepéről. Ha a gén fonálféreg rezisztenciát okoz, a konstrukciót tartalmazó gyökereken nem, vagy csak nagyon kis mértékben képződnek gubacsok, miközben a kontroll növények GFP-t emittáló gyökerei a szenzitív fenotípusra jellemző tüneteket mutatják. A fertőzés eredményének értékelése után, a gyökérmintákból poolozva RNS-t izolálunk, majd PCR segítségével is igazoljuk a génjelöltünk expresszióját.

5. Következtetések és javaslatok

A transzformált gyökerek mikroszkópos vizsgálata során a növények a vártnál gyengébb hatékonyságú transzformációt mutattak. A gyenge transzformáció oka, nagy valószínűséggel a fertőzés során használt elégtelen inokulum mennyiség következménye, azonban a transzformáció hatékonysága különböző növényfajtáknál is változó lehet. A wolfram tűvel történő fertőzés során nincs lehetőségünk pontosan kiszámított inokulum mennyiséget a tűre vinni, ezért a fertőzés során az egyéni tapasztalat is közrejátszik a megfelelő baktériummennyiség eltalálásában. További nehézséget jelent, hogy a túl nagy baktérium mennyiség alkalmazásának esetében jelentős növénypusztulás figyelhető meg. A fertőzött növényfelület később is hozhat transzformáns gyökereket így a tenyésztő csöveket rendszeresen figyelemmel kísérjük a jövőben is mikroszkóp alatt, amíg kiültetésre nem kerülnek.

A gyökérgubacs fonálféreg fertőzésével kapcsolatos kutatások egyik komoly nehézsége a patogén hosszú fertőzési ideje. Csoportunk jelenleg cserépbe ültetett növényeken végzi a fertőzést, fertőzött földet és gyökérdarabokat felhasználva. Földbe ültetett paprika növények esetében a fonálféreg fertőzés tüneteinek megjelenéséig legalább másfél-két hónap szükséges. Az *in vitro* körülmények között történő fertőzés felgyorsíthatja a fertőzési fenotípus kialakulását. A növények steril körülmények közt történő fertőzésének esetében a tünetek 20-30 nap lefolyása alatt megjelenhetnek a növényen. Csoportunk jelenleg is dolgozik egy könnyen alkalmazható gyökérgubacs fonálféreg sterilizálási eljárásán.

A génjelöltek esetében előnyös kutatási perspektíva lehet azok működésének és interakciós partnereinek vizsgálata. Ugyan az NBS-LRR gének működése ismert, a gyökérgubacs fonálféreggel kapcsolatos kutatások számára hasznos információ lehet a különböző effektor molekulák azonosítása. A transzkripciós faktor esetében, ha ez a gén bizonyul a rezisztencia forrásának, a rezisztencia kialakulásának módja komoly tudományos eredmény ígéretét hordozza. A *Me1* gén azonosítása után annak, sejten belüli kifejeződését egy fluoreszcens riporter fehérjével kapcsolt konstrukció segítségével vizsgálhatjuk. A gén interakciós partnereinek azonosításához például úgynevezett „pull down assay” és élesztő két-hibrid rendszert is használhatunk. A gén interakciós partnereinek vizsgálata közben, a rezisztencia gén és annak partnereivel történő fehérjekölcsönhatásokról is információt nyerhetünk. Mivel jelenleg a gén aktív részét képezi növénynemesítési programoknak, így pontos genetikai jellemzése fontos információval szolgálhat új fajták létrehozásához. Az eddig

dokumentált legtöbb fonálféreg rezisztencia génnel ellentétben a *Me1* szélesspektrumú és hőstabil, eddig át nem tört rezisztenciája más növényekbe bejuttatva is előnyökkel szolgálhat.

A jelen kutatás folytatásaként az NBLR2 és TF1mRNS konstrukcióink esetében is szeretnénk megismételni a fertőzést. Mivel az NBLR2 gén az NBLR1 génhez hasonlóan NBS-LRR motívumokat tartalmaz, így elképzelhető, hogy fontos szerepet játszik valamely patogén elleni rezisztencia kialakításában, így ez a gén is alapot szolgáltathat későbbi rezisztencia génekkel kapcsolatos kutatás indítására.

6. Összefoglalás

A gyökérgubacs fonálféreg fajok világszerte jelentős károkat tudnak okozni a növénytermesztésben, különösen a melegigényes fajok esetében és hajtatott körülmények között. A föld felmelegedésének köszönhetően kártételük szélesebb körben is elterjedhet a jövőben. A paprika a világ egyik legjelentősebb zöldség növénye, termesztése és fogyasztása Magyarországon kiemelkedő jelentőségű. Hazánk legnagyobb felületen hajtatott zöldségnövénye, ezért fontos cél lehet rezisztens fajták termesztése.

Diplomamunkámat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológiai Intézet Alkalmazott Növénygenomikai csoportjánál írtam a Gyökérgubacs fonálféreg (*Meloidogyne spp.*) szembeni rezisztencia genetikai hátterének kutatásáról paprika növényen. A csoport évek óta kutatja a gyökérgubacs fonálféreg szembeni rezisztenciát biztosító *Me1* gént. Kutatásaik során azonosították a *Me1* gén kromoszómális helyzetét, majd térképezési módszerekkel egy ~70 kbp-os régióra szűkítették le a *Me1* régióját.

A csoport a genomi régión paprika adatbázisok és bioinformatikai módszerek segítségével két gént azonosított, egy rezisztenciagénekre jellemző gén családba tartozó NBS LRR gént (NBLR1), valamint egy transzkripciós faktort kódoló gént (TF1). A két gén ideális jelölt lehet a rezisztens jelleg kialakítására, mivel a rezisztens és szenzitív szülők alléljaiban több aminosav cseréje is megtalálható. Kutatásunk célja a két lehetséges génjelölt szenzitív paprika növény (Fehérözön) gyökereibe juttatása volt, *A. Rhizogenes* közvetítette növénytranszformáció felhasználásával. A transzformált gyökerek *Meloidogyne incognita* állománnyal történő fertőzése után kiértékeljük a fertőzést, ezáltal információt kapunk a génjelöltjeink fonálféreg rezisztenciában betöltött szerepéről. A klónozáshoz szükséges konstrukciókat Gateway módszer felhasználásával hoztuk létre. A PK7WG2DNBLR1 konstrukció esetében 60 növényen, míg a PK7WG2DTF1CDS konstrukció esetében 110 növényen sikerült elvégezni a transzformáció folyamatát. A transzformáns növények gyökerein sikerrel detektáltuk a konstrukcióban használt *GFP* riportergén kifejeződését.

A transzformáción átesett növények még nevelési fázisban vannak, jelenleg a kiültetésre érett állapot elérést várjuk a cserébe ültetéshez. A kiültetés és fertőzés időtartama alatt a transzformációt a PK7WG2DTF1mRNS konstrukcióval is szeretnénk elvégezni, valamint a transzformációs kísérletekbe a Globál cseresznyepaprika fajtát is bevonni, amely a Fehérözönhöz hasonlóan szenzitív fenotípussal rendelkezik fonálféreg fertőzéssel szemben.

7. Köszönetnyilvánítás

Diplomamunkámat elsősorban szeretném megköszönni a konzulenseimnek Dr. Tóth Zoltánnak és Tóth Máténak, akik szakmai hozzáértésükkel végig segítettek a kutatási munka, valamint a diplomamunka elkészítése során.

Szeretném megköszönni az Alkalmazott Növénygenomikai Csoport tagjainak, akikhez bármikor fordulhattam kérdésekkel.

Köszönettel tartozom még a Növénygenomikai és Növény-Mikroba Interakció Csoportnak, azon belül is Dr. Horváth Beatrixnak, aki az agrobaktérium Arqual törzset, valamint a Gateway módszerhez szükséges vektorokat a rendelkezésünkre bocsátotta.

8. Irodalomjegyzék

1. Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A.-C., Nicole, M., Bertrand, B., Lashermes, P., & Etienne, H. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports*, 25, 959-967.
2. Altshuler, D., Daly, M. J., & Lander, E. S. (2008). Genetic mapping in human disease. *science*, 322(5903), 881-888.
3. Ameline-Torregrosa, C., Wang, B.-B., O'Bleness, M. S., Deshpande, S., Zhu, H., Roe, B., Young, N. D., & Cannon, S. B. (2008). Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, 146(1), 5-21.
4. Barbary, A., Djian-Caporalino, C., Marteu, N., Fazari, A., Caromel, B., Castagnone-Sereno, P., & Palloix, A. (2016). Plant genetic background increasing the efficiency and durability of major resistance genes to root-knot nematodes can be resolved into a few resistance QTLs. *Frontiers in plant science*, 7, 632.
5. Barbary, A., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Castagnone-Sereno, P., & Djian-Caporalino, C. (2014). The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes Me1 and Me3. *Theoretical and Applied Genetics*, 127, 499-507.
6. Belkhadir, Y., Subramaniam, R., & Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 391-399.
7. Bird, A. F. (1961). The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. *The Journal of Cell Biology*, 11(3), 701-715.
8. Bíró T. (2016): Gyökérgubacs-fonálférgék elleni vegyszermentes védekezés hajtatott paprikában. Doktori (PhD) értekezés, SZIE, Gödöllő, 146 p.
9. Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Palloix, A., & Dalmasso, A. (1996). Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 585-590.
10. Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., & Djian-Caporalino, C. (2001). New data on the specificity of the root-knot nematode resistance genes Me1 and Me3 in pepper. *Plant Breeding*, 120(5), 429-433.
11. Chitwood, D. J., & Perry, R. N. (2009). Reproduction, physiology and biochemistry. In *Root-knot nematodes* (pp. 182-200). CABI Wallingford UK.
12. DeYoung, B. J., & Innes, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature immunology*, 7(12), 1243-1249.
13. Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M.-J., Vernié, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., & Lefebvre, V. (2007). Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theoretical and Applied Genetics*, 114, 473-486.
14. Djian-Caporalino, C., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Barbary, A., Abad, P., Sage-Palloix, A.-M., Mateille, T., Risso, S., & Lanza, R. (2014). Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC plant biology*, 14, 1-13.

15. Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Januel, A., Lefebvre, V., Daubeze, A., Palloix, A., Dalmaso, A., & Abad, P. (1999). Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 496-502.
16. Fang, D., & Roose, M. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(3), 408.
17. Farkas K., Andrásy I. (1988): Kertészeti növények fonálféreg kártevői. Mezőgazdasági Könyvkiadó, Budapest, 418 p.
18. Fazari, A., Palloix, A., Wang, L., Yan Hua, M., Sage-Palloix, A. M., Zhang, B. X., & Djian-Caporalino, C. (2012). The root-knot nematode resistance N-gene co-localizes in the Me-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant Breeding*, 131(5), 665-673.
19. Glits M. Horváth J., Kuroli G. (1997): Növényvédelem. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 661 p
20. Grover, A., & Sharma, P. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
21. György Zs. (2013). Molekuláris markerezés. In: Lukács Noémi (szerk.): Növényi Biotechnológia. BCE Kertészettudományi Kar, Budapest, (175)50-60.
22. György Zs. (2022): Molecular marker technologies in Molecular Plant Breeding. MATE jegyzet, Gödöllő, 100 p.
23. Hammond-Kosack, K. E., & Kanyuka, K. (2007). Resistance genes (R genes) in plants. eLS.
24. Hartl, D. L. (1988). A primer of population genetics. Sinauer Associates, Inc.
25. Hendy, H., Dalmaso, A., & Cardin, M. (1985). Differences in resistant *Capsicum annuum* attacked by different *Meloidogyne* species. *Nematologica*, 31(1), 72-78.
26. Heszky L. (2011). Géntranszfer technikák. *Agrofórum* 8(3), 90-94.
27. Heszky L., Dudits D. (2014): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroiinform Kiadó, Budapest, 347 p.
28. Hwang, C.-F., Bhakta, A. V., Truesdell, G. M., Pudlo, W. M., & Williamson, V. M. (2000). Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the Mi gene product in regulation of localized cell death. *The Plant Cell*, 12(8), 1319-1329.
29. Idrees, M., & Irshad, M. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European academic research*, 2(1), 1513-1540.
30. Jenser G., Mészáros Z., Sáringer Gy. (2003): Szántóföldi és kertészeti növények kártevői. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 501 p
31. Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., & Wesemael, W. M. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14(9), 946-961.
32. Kifle, S., Shao, M., Jung, C., & Cai, D. (1999). An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports*, 18, 514-519.
33. Kiss, G. B., & Endre, G. (1999). Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. Balázs, E., Dudits, D.(Szerk.) Molekuláris növénybiológia. Akadémiai Kiadó, Budapest, 37-90.

34. Liu, Y., Cao, H., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., Xie, B., Zhao, J., & Mao, Z. (2023). Molecular cloning and functional analysis of the pepper resistance gene Me3 to root-knot nematode. *Horticultural Plant Journal*, 9(1), 133-144.
35. Lorieux, M., Ndjioudjop, M.-N., & Ghesquière, A. (2000). A first interspecific *Oryza sativa* × *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 593-601.
36. Lozano, R., Ponce, O., Ramirez, M., Mostajo, N., & Orjeda, G. (2012). Genome-wide identification and mapping of NBS-encoding resistance genes in *Solanum tuberosum* group phureja. *PLoS One*, 7(4), e34775.
37. Marone, D., Russo, M. A., Laidò, G., De Leonardis, A. M., & Mastrangelo, A. M. (2013). Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7302-7326.
38. Mándoki Z., Fail J. (2007): Növényházi polifág kártevők. *Agrolap*, 2, 14-15
39. McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome biology*, 7, 1-11.
40. Moreno, S., Martín, J. P., & Ortiz, J. M. (1998). Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, 101(1), 117-125.
41. Mun, J.-H., Yu, H.-J., Park, S., & Park, B.-S. (2009). Genome-wide identification of NBS-encoding resistance genes in *Brassica rapa*. *Molecular Genetics and Genomics*, 282, 617-631.
42. Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., & Labhane, N. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
43. Oláh R., Zok A. (2013). Genetikai transzformáció. In: Lukács Noémi (szerk.): *Növényi Biotechnológia*. BCE Kertészettudományi Kar, Budapest, (175)74-86.
44. Parisi, M., Alioto, D., & Tripodi, P. (2020). Overview of biotic stresses in pepper (*Capsicum* spp.): Sources of genetic resistance, molecular breeding and genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2587.
45. Paterson AH (1996). Making genetic maps. In: Paterson AH (ed.) *Genome mapping in plants*, San Diego, California: Academic Press, Austin, Texas, pp. 23–39.
46. Paterson, A. H., Bowers, J. E., Burow, M. D., Draye, X., Elsik, C. G., Jiang, C.-X., Katsar, C. S., Lan, T.-H., Lin, Y.-R., & Ming, R. (2000). Comparative genomics of plant chromosomes. *The Plant Cell*, 12(9), 1523-1539.
47. Paun, O., & Schönswetter, P. (2012). Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols*, 75-87.
48. Pedryc A. 2008. Kajszfajták genetikai jellemzése mikroszatellit és S-lókuszt polimorfizmus alapján. *Doktori Értekezés*, BCE, Budapest
49. Roychowdhury, D., Majumder, A., & Jha, S. (2012). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges. *Biotechnology for medicinal plants: Micropropagation and improvement*, 29-68.

50. Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjiondjop, M. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25).
51. Shao, Z.-Q., Xue, J.-Y., Wang, Q., Wang, B., & Chen, J.-Q. (2019). Revisiting the origin of plant NBS-LRR genes. *Trends in plant science*, 24(1), 9-12.
52. Shreni Agrawal, E. R. (2022). A Review: Agrobacterium-mediated gene transformation to increase plant productivity. *J. Phytopharm.*, 11, 111-117.
53. Song, H., Wang, P., Li, T., Xia, H., Zhao, S., Hou, L., & Zhao, C. (2015). Genome-wide identification and evolutionary analysis of nucleotide-binding site-encoding resistance genes in *Lotus japonicus* (Fabaceae). *Genet Mol Res*, 14(4), 16024-16040.
54. Szabadi N., Tóth Z., Hajnik L., Salamon P., Földi T., Kiss Gy. B., Szabó Z., Kaló P. (2016). Gyökérgubacs fonálféreggel (*Meloidogyne spp.*) szembeni rezisztencia genetikai hátterének kutatása paprikán (*Capsicum spp.*). Kutatói utánpótlást elősegítő program I. szakmai konferenciája. Gödöllő, Március 2016., 70-75.
55. Tanksley, S., Young, N., Paterson, A., & Bonierbale, M. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/technology*, 7(3), 257-264.
56. Tanksley, S. D. (1983). Gene mapping. In *Developments in Plant Genetics and Breeding* (Vol. 1, pp. 109-138). Elsevier.
57. Thies, J. A., & Fery, R. L. (2000). Characterization of resistance conferred by the N gene to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2, M. hapla, and M. javanica in two sets of isogenic lines of *Capsicum annuum* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(1), 71-75.
58. Törjék O. (2001). Különböző nyár, búza és kender genotípusok molekuláris (RAPD, SSR, AFLP, ÉS SCAR) jellemzése. Doktori Értekezés, SZIE Gödöllő.
59. Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual review of phytopathology*, 39(1), 53-77.
60. Uncu, A. T., Celik, I., Devran, Z., Ozkaynak, E., Frary, A., Frary, A., & Doganlar, S. (2015). Development of a SNP-based CAPS assay for the Me1 gene conferring resistance to root knot nematode in pepper. *Euphytica*, 206, 393-399.
61. Veena, V., & Taylor, C. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43, 383-403.
62. Wesemael, W., Viaene, N., & Moens, M. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in Europe. *Nematology*, 13(1), 3-16.
63. Yim, Y.-S., Davis, G. L., Duru, N. A., Musket, T. A., Linton, E. W., Messing, J. W., McMullen, M. D., Soderlund, C. A., Polacco, M. L., & Gardiner, J. M. (2002). Characterization of three maize bacterial artificial chromosome libraries toward anchoring of the physical map to the genetic map using high-density bacterial artificial chromosome filter hybridization. *Plant physiology*, 130(4), 1686-1696.
64. Zatykó, L. (1994): Értékesi paprika. In: Balázs S. (szerk.) *Zöldségtermesztők kézikönyve*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. (696) 226-256 p.
65. http1: <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5562116>
66. http2: <https://www.flickr.com/photos/scotnelson/8895703070/in/album-72157635415455383/>
67. http3: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2014/1146/oj>

68. http4: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
69. http5: <https://fruitveb.hu/fruitveb-bulletin-2019-zoldsegtermesztes-i-resz/>
70. http6: <https://magazin.fruitveb.hu/friss-piaci-paprikafelek-fogyasztasi-szokasai-magyarorszagon/>

9. Mellékletek

1. melléklet: LB baktérium táptalaj receptje

LB	1000 ml
Trypton	10 g
Élesztő kivonat	5 g
NaCl	5 g
pH	<7
Bakteriológiai agar (szilárd)	15 g

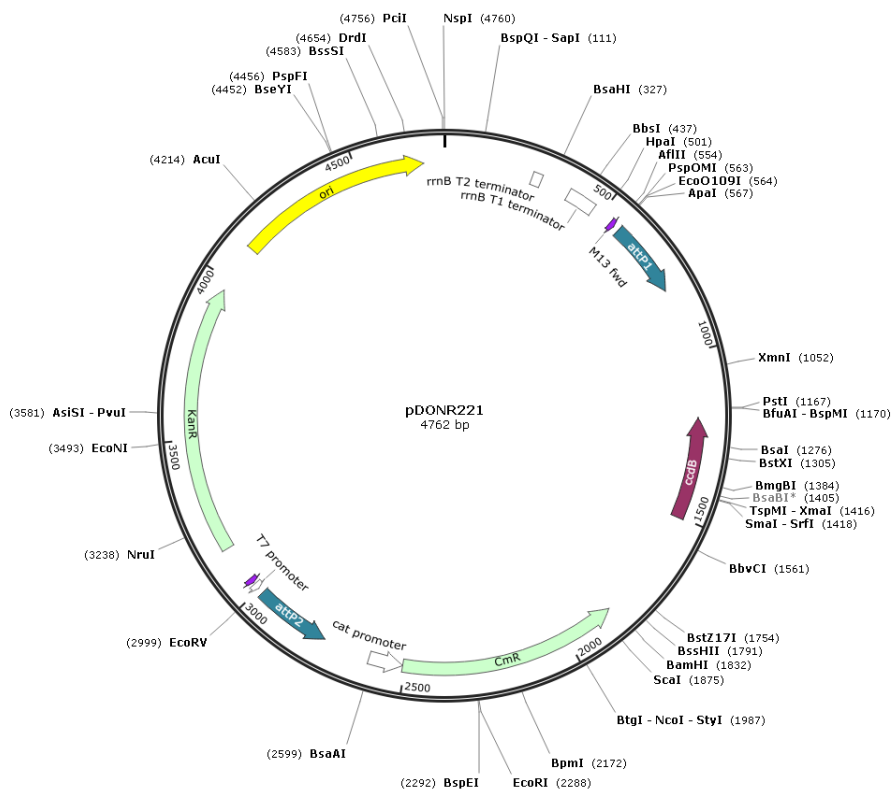
2. melléklet: MS Mikro és MS Makro oldatok összetevői, MS20 növényi táptalaj receptje

MS Mikro 1000X	100 ml	MS Makro 10X	1000 ml	MS20	1000 ml
H ₃ BO ₃	630 mg	NH ₄ NO ₃	16,5 g	MS makro	100 ml
MnSO ₄ x H ₂ O	1560 mg	KNO ₃	19 g	MS mikro	1 ml
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	860 mg	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4,4 g	KI	0,83 mg
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	25 mg	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3,7 g	NaFe-EDTA	36,7 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	2,5 mg	KH ₂ PO ₄	1,7 g	Myo-Inositol	100 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	2,5 mg			Thiamin-HCl	0,1 mg
				Pyridoxin-HCl	0,5 mg
				Nikotinsav	0,5 mg
				Glicin	2 mg
				Szacharóz	20 g
				Oxoid agar	5,8 g
				pH	5,8

3. melléklet: MPGY paprika gyökereztető táptalaj receptje

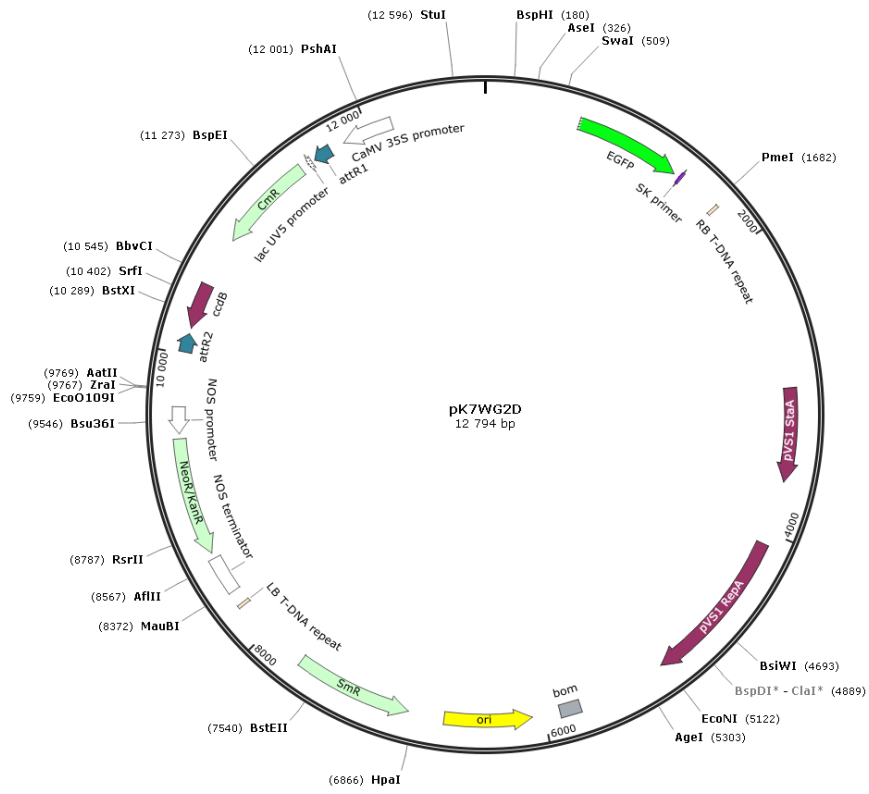
MPGY	1000 ml
MS makro	100 ml
MS mikro	1 ml
KI	0,83 mg
NaFe-EDTA	50 mg
Myo-Inositol	100 mg
Thiamin-HCl	0,5 mg
Pyridoxin-HCl	0,5 mg
Nikotinsav	0,5 mg
IAA	0,5 mg
Szacharóz	10 g
Glükóz	10 g
Maltóz	10 g
Oxoid agar	5,8 g
pH	5,8

4. melléklet: pDONRTM 221 donor vektor térképe



5. melléklet: pK7WG2D destination vektor térképe

Created with SnapGene®



4. sz. függelék – Hallgatói és konzulensi nyilatkozat minta

NYILATKOZAT

Alulírott PALOTAI CSABA, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, SZENT ISTVÁN Campus, MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS MSc 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 05 hó 09 nap



Hallgató

NYILATKOZAT

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

A Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatomot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

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

Kelt: 2023 év 05 hó 09 nap



Belső konzulens

*Kérjük a megfelelőt aláhúzni!