

DIPLOMADOLGOZAT

Gonda Attila

2023



**MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
SZENT ISTVÁN CAMPUS**

**GENETIKAI ÉS BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET,
MIKROBIOLÓGIA ÉS ALKALMAZOTT
BIOTECHNOLÓGIA TANSZÉK**

**MIKORRHIZA GOMBA HATÁSA PARADICSOM NÖVÉNY
KÖRNYEZETI TÉNYEZŐKRE ADOTT STRESSZ-
VÁLASZAIRA**

Konzulens: Dr. Mayer Zoltán
Egyetemi Docens

Készítette: Gonda Attila
Évfolyam: II. évfolyam

**Gödöllő
2023**

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzés	2
2.	Szakirodalmi áttekintés	3
2.1	Paradicsom termesztés	3
2.2	A paradicsom.....	4
2.3	A mikorrhiza gombák.....	5
2.4	Mikorrhiza gomba használata kertészeti kultúrákban	7
2.5	Mikorrhiza gomba és a biotikus stressz	8
2.6	Reaktív oxigénformák	11
2.7	Uborka mozaikvírus (<i>Cucumber mosaic virus – CMV</i>)	13
3.	Anyag és módszertan	14
3.1	Növénynevelés	14
3.2	RNS izolálás	14
3.3	DNáz kezelés	14
3.4	cDNS szintézis	15
3.5	Kvantitatív Real-time PCR.....	16
3.5	Statisztikai értékelés	17
4.	Eredmények.....	18
4.1	A vizsgált növények hajtás és gyökér tömeg változásai	18
4.2	A Kvantitatív Real-time PCR eredményei a vizsgált enzimekre	21
5.	Következtetések és javaslatok	24
6.	Összefoglalás	25
7.	Köszönetnyilvánítás	27
8.	Irodalomjegyzék	28
9.	Táblázatok és ábrák jegyzéke.....	31
10.	Mellékletek	32

1. Bevezetés és célkitűzés

Az agrárium számos kihívással szembesül napjainkban, amelyek között szerepelnek a környezeti stresszhatások, éghajlatváltozás, vízhiány, talajszennyezés és egyéb környezeti és természeti tényezők. Ezek a kihívások jelentős hatással lehetnek a növények növekedésére és termés hozamára.

A napjainkban az egyre extrémebb időjárási események, mint a hőhullámok, az aszály vagy éppen a heves esőzések folyamatos kihívások elé állítják a mezőgazdaságot. Néhány növényfaj viszont képes alkalmazkodni ezekhez a szélsőséges éghajlatváltozásokhoz. Például, genetikai változatosság és hibridizáció révén kifejleszthetők olyan fajták, amelyek ellenállóbbak az extrém időjárási viszonyokkal szemben. Az olyan környezeti hatások, mint például a vízhiány negatívan befolyásolhatja a növények vízellátását és fotoszintézisét. A vízgazdálkodás javítása, a szárazságtűrő növényfajták kifejlesztése és a csepegtető öntözési rendszerek bevezetése segíthet a vízhatékonyság növelésében.

A biológiai védekezés, az ellenálló fajták kifejlesztése és a fenntartható növényvédelmi stratégiák alkalmazása egy másik módja a védekezésnek. A növénybetegségek és kártevők okozta termesztési és növényvédelmi problémák megoldásában szükséges olyan, elérhető megoldások kutatása, amelyek a természetben is előfordulnak.

A kihívások megoldásához általánosan a fenntartható mezőgazdasági gyakorlatokra, az innovációra és a kutatásra van szükség. A mezőgazdaság jövője szempontjából a tudományos fejlesztések és az agrárium technológiai modernizációja kulcsfontosságú a termelékenység és fenntarthatóság szempontjából. A változásokhoz való alkalmazkodás első lépéseként tisztában kell lennünk a változások okaival, és fel kell ismernünk az alkalmazkodás módjait. Az alkalmazkodás módjait azonban széleskörű vizsgálatok útján deríthetjük fel.

Ezek nyomán kísérletünk célja arbuszkuláris mikorrhizával (*Funneliformis mosseae*) oltott paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.) var. MoneyMaker növények vizsgálata volt. Ezek a paradicsomok későbbi fejlődési szakaszukban uborka mozaik vírussal (*Cucumber mosaic virus* – CMV) lettek megfertőzve. Ez által arra kerestük a választ, hogy az arbuszkuláris mikorrhiza gomba milyen hatással volt a fertőzött növényekre.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 Paradicsom termesztés

A FAOSTAT adatai szerint 186.821 millió tonna paradicsomot termesztettek 5.051.983 hektáron 2020-ban, 37,1 tonna paradicsom termésével hektáronként. További adatok szerint, 2020-ban Spanyolország paradicsom termelése háromszor volt nagyobb Marokkóénál és 4,74-szer nagyobb Hollandiánál. Törökország háromszor annyit termelt, mint Spanyolország és Kína, a világ legnagyobb paradicsom termelője, 15-ször több paradicsomot termelt, mint Spanyolország. Kína a saját 64.768 millió t/ha-os termelésével a világ teljes termelésének a 34,67%-át adja. 2020-ban 1.107.485 hektáron termesztettek paradicsomot, ami 58,5 t/ha-os termés hozamot hozott. India, a második legnagyobb termelő, 2020-ban 20.573 tonna paradicsomot termesztett 812.000 hektáron, ami 25,3 t/ha-os termés hozamot eredményezett. A harmadik helyen Törökország állt 13.204 millió tonna termesztett paradicsommal, amit 181.879 hektáron termesztettek és 72,6 t/ha-os termés hozamot eredményezett. Negyedik helyen pedig az Amerikai Egyesült Államok (USA) állt 12.227 millió tonna termesztett paradicsommal, amit 110.439 hektáron termesztettek és 110,7 t/ha-os termés hozamot eredményezett (HTTP1).

Hazánkban a XVII. században vált népszerűvé a paradicsom, amit akkor még csak dísznövényként szaporították. Emberi fogyasztásra történő termesztése Dunakeszi környékéről indult el az 1870-es évek elején, majd áterjedt a Hajdúságra, Kecskemét, Békés és napjainkban már Szentes környékére is (HTTP2).

A legfontosabb hajtatott zöldségfajaink között szerepel, körülbelül 310 hektáron folyik a termesztése. Az elmúlt években észrevehető volt az üvegházi termesztés intenzív technológiai fejlesztéseknek köszönhetően, hogy növekedett a hajtatott zöldségek termelése, köztük a paradicsomé is. Bővítésekkel lehetőség van a termelési szezon széthúzására, így akár egész évben elérhető a friss hazai paradicsom és csökkenthető az import mennyisége. Jelenleg a belföldi piacokon túlkínálat áll fent, itthon termesztett áruk mellett import áruk is megtalálhatók. A fűtős paradicsom termeléséből, április és október között, önellátóak vagyunk, az ebben az időszakban megtermelt mennyiség a belső piacot teljesen lefedi, így a fenn maradó mennyiséget exportálhatjuk. Ez hasonlóan elmondható a koktél paradicsom termelésünkről is, bár ennek exportja kevésbé jelentősebb, mint a fűtős paradicsomé (HTTP3).

2.2 A paradicsom

A paradicsom (*Lycopersicon esculentum*) a burgonyafélék (Solanaceae) családjába és azon belül a *Lycopersicon* nemzetségbe tartozik. A *Lycopersicon* nemzetséget két alnemzetségre lehet bontani, *Eulycopersicon*-ra és *Eriopersicon*-ra. Az *Eulycopersicon* alnemzetségbe tartozó minden faj bogyója piros színű biológiai érettségében, míg az *Eriopersicon* alnemzetségnél a bogyók zöld színűek. Ez azzal magyarázható, hogy a *Eriopersicon*-ba tartozó faj bogyója nem tartalmaz piros színanyagot (HELYES 1999). A növény és a *Solanum* fajok géncentruma Dél-Amerikában, azon belül is Peru, Bolívia, Ecuador, Kolumbia és Chile területén található.

A paradicsom egy lágyszárú és kétszikű, hosszúnappalos (5000 lux fényigényű), egy éves növény. Gyökérzete igen erős, karógyökere 30 - 40 cm mélyre is lehatol, azt erős szerkezetű mellékgyökerek hálózák körbe. Sajátossága, hogy járulékos gyökereket is tud fejleszteni, ha a szárának egyes részei föld alá kerülnek. A paradicsomot érintő szártő-betegségek ellen bakhátazással megmenthető a növény. Erősen szörözt szárrendszerrel és bordázott felülettel rendelkezik, antocián tartalmuk pedig fajonként eltérő. Ezt jelzi az erős lila elszíneződés. Növekedését tekintve lehet folytonos vagy determinált. Levelei összetettek, levélkéi karéjosak, felületük pedig erősen szörözt. Fajtától függetlenül igen nagy levélfelülettel rendelkeznek, ezért párologtatásuk intenzív. Álfürt virágzattal rendelkeznek, virágának legfontosabb jellemzője, hogy a portokok laterálisan kapcsolódva egy csövet képeznek a bibe körül. A portokok hosszabbak, mint a bibeszál, maga a portokcső körül veszi a bibét. Ennek köszönhetően képes az önbeporzásra. Ha nem képződik virágpor a portokokban akkor valódi hímsterilitásról van szó. Ha mégis képződik pollen, de gátolt a portokok felnyílása, akkor funkcionális hímsterilitásról beszélünk. Termékenyülésében segítenek a vadrovarok, intenzív hajtás esetén pedig a posztméhek. Bizonyos fajtájú paradicsomoknál, a folytonos növekedésű paradicsomoknál, a virágzás folytonos, nem különül el a bogyófejlődés időszakától, viszont a determinált fajtáknál a virágzás után elkülönülve megy végbe a termésfejlődés folyamata. Magjai aprók, laposak és szörözttek, csírázókéességüket megőrzik akár 3 - 4 évig is. Lédús termése, ami igen értékes élettani anyagokat is tartalmaz, bogyótermés. Kiemelendő az antioxidáns hatású likopin tartalma. Biológiai érettségében színe piros, de sokszor a korall színű paradicsomokat is értékesítik (HTTP2).

Az étkezési paradicsom a morzsalékos szerkezetű, könnyen melegedő és jó vízháztartású talajokat kedveli. Ezek alapján hazánkban az Alföld talajviszonyai megfelelnek a paradicsom szabadföldi termesztéséhez. Tápanyagigényét tekintve, vegetatív fejlődéséhez és

bogyónövekedéséhez, jelentős mennyiségű nitrogént, káliumot, magnéziumot és kalciumot igényel. Szerves trágya mellett érdemes teljes értékű műtrágyákat is alkalmazni. Magas hőigénnyel rendelkezik, átlag 22 ± 7 °C (Markov-Haev). Érzékeny a kalciumhiány kialakulására a nyári hajtatási időszakban, ezt megelőzendő, a paradicsom növények öntözését a kora reggeli órákban érdemes elvégezni. Ez által a gyökérszóna lehül olyan pontra, ahol még a kalciumot képes felvenni. Vízigénye 500 - 600 mm a teljes tenyészidőszak alatt. Napi vízigénye változó, a hőmérséklettől és a növény méretétől függően. Csepegtető rendszeres öntözése estén a tápoldatok is könnyen kijuttathatók. Növényápolás szempontjából kikötözni és kacsózni érdemes a paradicsomot, a generatív-vegetatív egyensúly fenntartása végett. A gyomok irtását érdemes mechanikai úton végezni, nem ajánlott a kémiai gyomvédelem (HTTP2).

2.3 A mikorrhiza gombák

A különböző rendszertani csoportok és földrajzi területek, élőhelyek diverzitásának feltártságában, nagy különbségek vannak. Ez különösen igaz a növények gyökereivel kapcsolatot alkotó nem patogén gombákra, mivel ezek alapvetően talajlakók, és mivel vannak olyan tagjai ennek a csoportnak, amik képeznek makroszkopikus termőtesteket, akadnak köztük olyanok, mint a szarvasgombák, akik ezeket a makroszkopikus termőtesteket a felszín alatt a talajban hozzák létre. Ráadásul, a nem patogén gyökéraszociált gombák nem okoznak olyan mértékű elváltozásokat, amit a felszínen is észre lehetne venni. A száraz és félszáraz területek, kevésbé ismert élőhelyeik, pedig az ilyen területeken, az abiotikus stressznek erősen kitett környezetben, a nem patogén gyökérekolonizáló gombák, például a növényeket segítő, azok szárazságtűrését növelő mikorrhizaképző gombák, vagy a gyökérendofitonok, különösen hasznosak lehetnek (HTTP4).

A növények életük során folyamatosan kölcsönhatásba lépnek számtalan mikroorganizmussal, archaeákkal, baktériumokkal, gombákkal és vírusokkal is, azonban csak korlátozott számú mikroorganizmus hoz létre szimbiotikus kapcsolatot gazdáival. A gombák szimbiotikus kapcsolatokat alkothatnak a növényekkel, és ezek pozitív vagy negatív hatással lehetnek a gazdaszervezetre. A növényekre pozitív hatással bíró szimbionták közé tartoznak a mikorrhiza gombák (pl. *Rhizophagus irregularis*) és fű endofiták (pl. *Epichloe festucae* var. *lolii*), míg más gombafajok mint például a *Botrytis cinerea* és a *Sclerotinia sclerotiorum* olyan gombák, amelyek negatív hatással vannak a gazdanövényeikre. Érdekes módon a növényekkel kapcsolatot létesítő gombák gyakran kölcsönhatásba lépnek más mikroorganizmusokkal is, például

baktériumokkal. Ezek a baktériumok viszont közvetlenül befolyásolhatják a gazdanövényt is azáltal, hogy elősegítik vagy gátolják a növényeket, vagy közvetetten befolyásolhatják a növényekkel kapcsolatot létesítő gombákon keresztül (Bastías et al. 2020).

A növények és a mikroorganizmusok közötti kapcsolatok mellett, a baktériumok és a gombák között is kialakulnak szimbiota kapcsolatok. Ezeknek a bakteriális-gombás szimbiózisoknak a jellemzése kimutatta, hogy a bakteriális szimbiotáknak két típusa létezik, a bakteriális ektoszimbioták és a gombák endoszimbiotái, és ezek megkülönböztethetők a gazdagombával való fizikai kapcsolatuk alapján. A gombák bakteriális endoszimbiotáit korábban endofungális vagy endohifális baktériumoknak is nevezték, és ez a fajta szimbiózis a legszorosabb fizikai összefüggés, amelyet a baktériumok és a gombák között valaha megfigyeltek. A gombák endoszimbiotikus bakteriális társulásaiban a baktériumok túlélése általában nagymértékben függ a gazdaszervezettől. Korábbi feljegyzések alapján leírtak obligát és fakultatív szimbiózisokat, ahol a bakteriális endoszimbiota, gazdagombától való függésének mértéke változhat attól függően, hogy ezek a baktériumok milyen mikrobiális életmódot folytatnak. A bakteriális endoszimbiotákat számos növényrel kapcsolatot létrehozó gombában kimutatták, és bizonyos társulásokon belül ezek a szimbioták létfontosságú tevékenységeket végeznek a gazdagomba számára (Bastías et al. 2020).

A növények gyökerei és a talajgombák (mikorrhizák) közötti szimbiotikus kapcsolatok gyakoriak a természetben. Életciklusuk befejezéséhez a szimbiota mikorrhizáknak nem specifikus gazdákra van szükségük; javíthatják a talaj fizikai és kémiai tulajdonságait, és szűrőként működhetnek, hogy megakadályozzák az idegen szervezetek bejutását a micéliumba. Szimbiotikus társulásaikban a gombák esszenciális szénhidrátokat és egyéb tápanyagokat kapnak a gazdanövényeiktől, még a gazdanövények vizet és szintén tápanyagokat kapnak a gombáktól. Az arbuszkuláris mikorrhiza (AM) a leggyakoribb szimbiotikus kapcsolat a növények és a gombák között. Az arbuszkuláris mikorrhiza gombák (AMF) szimbiotikus kapcsolatot létesítenek a szárazföldi növények 80 - 90%-ának gyökereivel, és létfontosságú szerepet játszanak a növények növekedésének különböző szakaszaiban (Zhu et al. 2022).

2.4 Mikorrhiza gomba használata kertészeti kultúrákban

A kertészeti növényeket az emberek széleskörben felhasználják, élelmiszer-forrásként, (beleértve a zöldségeket, gyümölcsöket, fűszereket és dióféléket) virágtermesztésre, valamint dísz-, gyógyászati és aromás célokra is. A magas szintű fitokemikáliákat (pl. karotinoidokat, flavonoidokat és polifenolokat) és egyéb egészségügyi előnyöket tartalmazó kertészeti növények előállítása, a jelenlegi kutatások egyik fő célja, figyelembe véve az egészségesebb termékek iránti folyamatosan növekvő keresletet. Az abiotikus stresszek, mint például a szárazság, sótartalom, a szélsőséges hőmérséklet és a nehézfémek, valamint az olyan biotikus stresszek, mint a baktériumok, gombák, vírusok és egyes növényevő rovarok, súlyosan befolyásolják a termés hozamot és a termés minőségét. Az elmúlt néhány évtizedben több tanulmány is rávilágított az AMF lehetséges felhasználási területeire; például az AMF és a növényi gyökerek által alkotott micéliumhálózat jelentősen bővítheti a növény gyökereinek talajjal való érintkezését, ezáltal javítva a növények növekedését és fejlődését. Általánosságban elmondható, hogy az AMF fontos talajmikrobiális erőforrás, amely a növények különféle stresszekkel való megbirkózásában segít. Az AMF-fel történő beoltás önmagában javíthatja a kertészeti növények növekedését és fejlődését, valamint javíthatja a környezeti stressztűrő képességüket; az AMF más vegyületekkel való kombinációja azonban tovább elősegítheti az AMF megtelepedését és növekedését, javíthatja a gazdanövény tápanyag-felhasználási arányát, és ezáltal erősítheti a szimbiotikus kapcsolatot a növény és a mikorrhiza gombák között (Zhu et al. 2022).

2.5 Mikorrhiza gomba és a biotikus stressz

A növényeket érő stresszt Larcher (1987) a következőképpen írta le: „A stressz egy olyan terheléses állapot, amelyben a növényvel szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz.”

Biotikus stressz faktorok közé tartoznak az élő szervezetek, mint a baktériumok, vírusok, gombák vagy nematódák által előidézett stressz hatások (Atkinson és Urwin 2012). Maga a biotikus stressz negatívan befolyásolja a termelékenységet, a növények növekedési teljesítményt és a szervezetek túlélését, illetve változásokat okoz a növényekben morfológiai, élettani, biokémiai vagy akár molekuláris szinten (Manickavelu és mtsai. 2010, Sepehri és Golparvar 2011, Molazem és Azimi 2015). Biotikus stressz hatása alatt a növényt fertőző, vagy támadó élőlények sokfélesége nehezíti a növény számára a szervezetekkel szembeni szükséges védekezési reakciókat. Ezek az élőlények a világ növénytermesztésében akár 30%-os termésvesztést is okozhatnak (Bebber és Gurr 2015).

Figyelembe véve azt, hogy a zöld növények sok organizmus számára jelentős energiaforrást jelentenek, nem meglepő, hogy a növények különféle rezisztencia-stratégiákat fejlesztettek ki, amelyek károsodás után konstitutívan előidézhetők. Az arbuszkuláris mikorrhiza megvédi a gazdanövényeket a különböző biotikus stresszektől azáltal, hogy önmagában vagy más, a növény közvetlen befolyása alatt álló régiókban élő mikroorganizmusokkal együtt hat. Az arbuszkulárt mikorrhizával kolonizált növények jobb túlélési arányt, növekedést és fokozott rezisztenciát mutatnak a növényi kórokozókval szemben (Dowarah et al. 2022).

A mikroszimbionták szerepe a biotikus stresszek kezelésében egyre fontosabbá válik. Számos tanulmány igazolta, hogy az AMF csökkenti a különféle növényi kórokozók által okozott károkat (Diagne et al. 2020). Korábbi tanulmányok például azt mutatják, hogy a szójabab szén gyökérrothadásos betegségének súlyossága csökkenthető AMF-oltással (Spagnoletti F.N. et al. 2020). *Fusarium* jelenlétében az arbuszkuláris kolonizáció pedig növelte a hajtás száraz tömegét (Vos C. et al. 2012). Az AMF általi kolonizációnak védőhatása van, amelyet mikorrhiza által kiváltott rezisztenciának (MIR) neveznek, ez szisztémás védelmet nyújt a támadók széles köre ellen, és ami a kórokozó fertőzés utáni szisztémás szerzett rezisztenciához (SAR), valamint a gyökértelepítést követő, nem patogén rizobaktériumok által indukált szisztémás rezisztenciához

(ISR) hasonló. Ezt a mikorrhiza által kiváltott betegségekkel szembeni rezisztenciát Cameron D. D. et al. (2013) írta le. Ezek a szerzők kimutatták, hogy az AMF fokozza az antioxidáns enzimek termelését a növényekben, amelyek védő mechanizmusként szolgálhatnak a kórokozók és más stressz faktorok ellen. A növényvédelmi mechanizmusok aktiválásán túlmenően a kórokozók AMF által okozott csökkent károsodásának számos egyéb okáról számoltak be, mint például a gazdanövény tápanyag-állapotának javulása, a gyökérnövekedés és morfológia megváltozása, a kolonizációs helyekért és a gazdaszervezet fotoszintetizációja által elő állított termékeiért való versengés, valamint a mikorizoszférában bekövetkező mikrobiális változások. A növények növekedésének javulásának pozitív hatása lehet, mivel a mikorrhizák elősegíthetik a szövetek visszánövekedését támadások után. Ennek azonban lehetnek negatív hatásai is, mert a növények tápanyag-állapotának javulásával táplálóbbá vagy vonzóbbá válhat a növényevő rovarok számára. Az AMF hozzájárulása a növények patogén gombák és nematódák elleni védelmében jól dokumentált. Érdekes viszont megemlíteni, hogy a kölcsönhatások hatékonysága változhat a gazdanövénytől és a tenyésztési rendszertől függően (Diagne et al. 2020).

Dokumentáltan kimutatták, hogy a paradicsomnövényeket súlyosan érintik a baktériumok, gombák, vírusok és fonálférgek által kiváltott biotikus stresszek. A *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) és *Alternaria solani* két pusztító gombás kórokozó, amelyek a paradicsomot érintik, és fuzáriumos hervadást, illetve korai rothadást okoznak. A *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* egy talajban terjedő kórokozó, amely a növény érrendszerét támadja, míg az *Alternaria solani* egy lombkórokozó, amely a föld feletti részekben okoz kárt (Sachdev S. et al. 2023).

A *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (FOL) által kiváltott biotikus stressz az egyik felelőse a paradicsom hervadási betegség miatti intenzív termésveszteségéért. A FOL által okozott hervadásos betegség biológiailag káros hatásainak enyhítésére a biológusok alternatív eszközöket kerestek, mint az arbuszkuláris mikorrhiza gombákat (AMF), amelyek az egyik leghatékonyabb biológiai stratégiák a hervadásos betegségek leküzdésére. Az AMF rezisztenciát váltott ki a védekezéssel kapcsolatos fehérjék és ozmolitok felhalmozódásának fokozásával, és az antioxidáns rendszer erősítésével. Az antioxidáns rendszer a reaktív és nem reaktív komponensekből áll, amelyek közvetíthetik a ROS eltávolítását, ezáltal megvédi a növényeket az oxidatív robbanás okozta stressztől. A szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz (CAT), az aszcorbát-peroxidáz (APX) illetve több másik enzimatiszus komponens szorosan együttműködnek a ROS semlegesítésében. Az AMF által kiváltott pozitív változások a gazdanövények növekedésének javulását tükrözik, és ezt

követően javítják azok képességét, hogy ellenálljanak a stressz által kiváltott káros változásoknak. Az AMF által kiváltott stressz enyhülését kulcsfontosságú fitohormonok, mint például auxinok, citokinek, jázmonátok stb. aktív részvétele mellett is megfigyelték, és kimutatták, hogy az abszcizinsav szintézisében részt vevő indol-ecetsavat, indol-vajsavat és nin-ecisepoxi-karotinoid-dioxigenáz kódoló gének fokozottan szabályozott expressziója javította árpában a fuzáriummal szembeni toleranciát. Ezért az AMF és a növények közötti szimbiotikus kapcsolat új utakat kínál a növényi patogén gombák elleni alternatív stratégiák kidolgozására (Hashem A. et al. 2021).

A mikorrhiza gomba növény kolonizációja a kórokozók és kártevők széles spektrumával szembeni védekezés fokozásában is szerepet játszik, ezt a jelenséget mikorrhiza indukált rezisztencia (MIR) néven ismerik. Az AMF-fel való szimbiózis serkenti a növény immunrendszerét, ami egy primer állapothoz vezet, ami a védekező válaszok hatékonyabb aktiválását jelenti a biotikus támadást követően. Stressz hiányában a mikorrhiza növények védekezőképessége enyhén aktiválódik, így lehetővé válik a növények számára, hogy erőforrásaikat más biológiai funkciókhoz irányítsák át (alacsony költségű védekezési stratégia). Stressz jelenlétében a mikorrhizált növények gyorsabb védekezési reakciót válthatnak ki, mind a föld alatt, mind a felett. A mikorrhiza gomba növény kolonizációjának védő szerepe a gyökér szintjén bizonyított a talajban terjedő kórokozókkal, fonálférgekkel vagy gyökérrágó rovarokkal szemben, míg a föld feletti szövetekben a MIR fokozza a nekrotróf kórokozókkal és a generalista rágó rovarokkal szembeni ellenállást. A föld feletti szövetekben a MIR-t irányító mechanizmusok még mindig nem ismertek, de egyre több bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a mikorrhiza növények leveleiben transzkripciós és metabolikus átkonfiguráció alakult ki, ami MIR-reakciókhoz vezetett. A növényevők elleni teljes védekezési válasz megszervezéséhez a növények a jázmonsav (JA) jelátviteli útvonalra támaszkodnak, amely egy konzervált jelenség, amely a rovarok kártétele után aktiválódik, és védekező vegyületek, például másodlagos metabolitok (pl. terpenoidok, fenolok), alkaloid vegyületek és fehérjék (pl. proteáz inhibitorok, polifenoloxidázok) felhalmozódásához vezet. Ezek a védekező molekulák elriasztják a rovarokat a növények elfogyasztásától azáltal, hogy közvetlenül gátolják a rovarok növekedését. Ezenkívül kölcsönhatásba lépnek a növényevő mikrobiómával, közvetve megváltoztatva a rovarok alkalmasságát, és a cél rovarokat érzékenyebbé tehetik az olyan biotikus stresszekkel szemben, mint az entomopatogének (Frattini A. et al. 2022).

A mikorrhiza gyakran vezet a gyökérokórokozók elleni védekezéshez, de úgy tűnik, hogy ezzel ellentétes hatást fejt ki a levélkórokozókra. Egy tanulmány azt kutatta, hogy az *Alternaria solani* nekrotróf gomba által okozott mikorrhiza milyen hatással van paradicsomra. Az *Alternaria* nemzetség által kiváltott nektrózt és az összes levél klorózist mikorrhiza és nem mikorrhiza növényeken tanulmányozták egy ideig, valamint a talaj különböző P-szintjeit is figyelembe vették. A mikorrhizával kezelt paradicsomnövények szignifikánsan kevesebb *Alternaria solani* tünetet mutattak, mint a nem mikorrhizával kezelt növények, de sem a növények növekedését, sem a foszfátfelvételt nem javították. A megnövekedett foszforellátottság nem volt hatással a betegség súlyosságára a nem mikorrhizával kezelt növényekben, de a kezelt növényekben a betegség súlyosbodásához vezetett. Ez párhuzamos volt a mikorrhiza képződésének P-ellátás által kiváltott csökkenésével. A mikorrhizák *Alternaria solani* kifejlődését védő hatása néhány párhuzamot mutat a rizobaktériumok által közvetített indukált szisztémás rezisztenciával: mindkét biokontroll gyökér-asszociált organizmus, és mindkettő hatékony a nekrotróf kórokozók ellen (Fritz M. et al. 2006).

2.6 Reaktív oxigénformák

Az olyan molekulákat, amelyek egy vagy több oxigénatomot tartalmaznak, reaktív oxigénformáknak (ROS) nevezzük. Az olyan kémiai anyagok, amelyek önállóan léteznek és párosítatlan elektronokat tartalmaznak szabad gyököknek nevezzük (Mittler 2017). Léteznek olyan szabadgyökök, amiknek nincsen oxigénatomja (átmenetifém vagy szénközpontú gyök). Több formájuk is lehet, mint például szinglett oxigén (O^2), hidroxilgyök ($-OH$), hidrogén peroxid (H_2O_2), szuperoxid gyök (O_2^-) vagy nitrogén-monoxid ($-NO$) melyek fontos szerepet játszanak az oxidatív stressz jelzésében. Az ROS több más formában is jelen lehet, mint peroxil, alkoxil és hidroperoxil gyökök vagy peroxinitrit és hipoklórsav. A növényeket érő stressz hatása alatt képződő legfőbb ROS-ek a szinglett oxigén ($1O_2$), hidroxilgyök ($-OH$), hidrogén peroxid (H_2O_2) és a szuperoxid gyök (O_2^-) (Azevedo Neto et. al. 2008).

Az oxidatív stressz során az ROS és a szabadgyökök elősegítik a növényi sejtek összetevőinek oxidációját. Maga a kifejezés, hogy „oxidatív stressz” többféle jelentéssel rendelkezik. Egyrészt egy „élettani állapotnak” nevezhető, mivel amikor az elektronok leadásának (oxidáció) a mennyisége meghaladja az elektronok felvételének (redukció) a mennyiségét a sejtek kémiai (oxidatív) károsodásához vezet. Tehát az oxidatív stressz az elektron

hiány miatt súlyos és hosszú távú redox (redukciós / oxidációs) egyensúlyhiányból adódik. Másrészt pedig tekinthető egy stresszhatásnak is, ami a sejteket károsítja, illetve jelző- és védekezési reakciókat vált ki. Az oxidatív stresszt okozó tényezők főként a következőkre terjednek ki: a ROS-termelés és a méregtelenítés közötti egyensúlyhiány a "normál" sejtbiológiai élettani zavar miatt; (ii) ROS bioszintézis, de novo, mint stressz jelzés szükséges része a védekezés és az adaptáció során (Nawkar et al. 2013).

A növények összetett védekezési rendszerrel rendelkeznek az oxidatív stresszel szemben. Ami enzimatis és nem enzimatis komponenseket tartalmaz. Az enzimatis komponensek közé tartozik a szuperoxid-dizmutáz (SOD), kataláz (CAT), guajakol-peroxidáz (G-POD), aszkorbát-peroxidáz (APX), glutation-peroxidáz (GPX), glutation-reduktáz (GR) és más enzimek. Ezek az enzimek a sejt különböző részeiben működnek, és reagálnak, amikor a sejtek oxidatív stresszt tapasztalnak (Meitha K et al. 2020).

A szuperoxid-dizmutáz egy olyan enzim, amely szerepet játszik a szuperoxid oxigén- és hidrogén-peroxiddá alakításában. Köztudott, hogy az SOD-aktivitás fokozódik, ha a növények környezeti stressznek vannak kitéve, például szárazság és sótartalom esetén. Így a megnövekedett SOD-aktivitás gyakran korrelál a növények környezeti stresszel szembeni toleranciájának növekedésével. Egy másik antioxidáns enzim a kataláz, amely egy mindenütt jelenlévő tetramer enzim, amely hemet tartalmaz. A kataláz katalizálja a két hidrogén-peroxid molekula vízzé és oxigénné történő dismutációját. A kataláz nagy specifitású a hidrogén-peroxiddal szemben, de csekély az aktivitása a szerves peroxiddal szemben. A CAT enzimnek kisebb az affinitása az APX-hez képest, de nagyobb a forgalma. Willekens et al. (1995) szerint a dohány-növényekben háromféle CAT létezik a dohány génexpressziós profilja alapján. Az I. osztályú CAT-ok fotoszintetikus szövetekben expresszálódnak, és a fény szabályozza őket. A II. osztályú CAT-ok széles körben expresszálódnak az érszövetekben, míg a III. osztályú CAT-ok széles körben expresszálódnak a magvakban. A növényeket érő környezeti stressz a CAT aktivitás növekedését vagy csökkenését okozhatja, a stressz intenzitásától és időtartamától, valamint magától a környezet típusától függően (Meitha K et al. 2020).

2.7 Uborka mozaikvírus (*Cucumber mosaic virus – CMV*)

A vírusok mindenütt jelenlévő obligát intracelluláris paraziták, amelyek világszerte súlyos betegségeket okozhatnak. A vírusfertőzések drámaian ronthatják a gazdanövények teljesítményét az asszimilálódó fotoszintetikus szén gátlásával, ezek mellett számos a növényekben lejátszódó folyamatot is megváltoztathatnak, mint például sejtciklus, transzport, fehérjeszintézis, másodlagos anyagszere vagy hormon szabályozás módosítása, valamint illékony és nem illékony izoprenoidok bioszintézisének gátlása, amik elősegítik a vírusok átvitelét és replikációját (Miozzi L. et al. 2020).

Napjainkig a genetikai rezisztencia kialakítása és a vektorok szabályozása (rovarok, gombák stb.) a legelterjedtebb védekezési stratégia a vírusok elleni védekezésben. A vírusok magas mutációs rátája miatt azonban csak korlátozott számú hatékony növényi rezisztenciagén áll rendelkezésünkre, és a genetikai keresztezéssel való ellenállás sem mindig érhető el. Ezen túlmenően a vírusvektor-populációk korlátozását célzó fizikai vagy kémiai módszerek, mint például a fizikai gátak és a kémiai rovarirtó szerek, hasznosak, de nem meghatározóak a vírusfertőzés ellensúlyozásában, és akár negatív következményekkel járhatnak a nem célszervezetekre, a közegészségügyre és a környezetre (Miozzi L. et al. 2020).

Az uborka mozaikvírus (CMV, a Cucumovirus nemzetség, Bromoviridae család) egy gazdaságilag fontos RNS-vírus, amely a növényi vírusok kórokozóinak top 10-es listájába tartozik, és világszerte jelentős mezőgazdasági hatással bír. A CMV sok gazdanövényrel rendelkezik, körülbelül 1200 fajjal több mint 100 növény családban; nem prezisztens módon levél tetvek terjesztik, egyes esetekben, eltérő hatékonysággal, magvakban is tovább terjedhet. A növények tünetei gazdafajtától és/ vagy CMV-törzstől függően változnak, tünetei lehetnek a klorózis, a nekrózis, a törpülés és a levélfejlődési rendellenességek. A vírusgenom három genomális és két szubgenomális RNS-ből áll (Miozzi L. et al. 2020).

3. Anyag és módszertan

3.1 Növénynevelés

Munkánk során paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.) var. Moneymaker magokat használtunk, melyeket csíráztatás után sterilizált homokba ültettünk ki, úgy, hogy mintáink felét (8 növényt) oltottuk arbuszkuláris mikorrhizával (*Funneliformis mosseae*), másik felén nem történt mikorrhiza gomba oltás. A növények fertőzése (CMV) 6 leveles állapotban történt, a növényeket további 6 hétig neveltük standard körülmények között (16/8 órás világos/sötét, 26-20°C (éjjel/nappal), 60%-os páratartalom), melyet EKOCHL1500 típusú termosztát segítségével biztosítottunk. A mintákat a hajtás és gyökér tömeg meghatározását követően, -80°C-on tároltuk felhasználásig.

3.2 RNS izolálás

A paradicsom növényen végzett génexpressziós vizsgálat első lépéseként a növényi mintákból RNS-t izoláltunk a „Vantage Total RNA Purification Kit”-tel (Origene, USA) a gyártó által megadott protokoll szerint. Az RNS izoláláshoz 50 mg tömegű növényi szövetet vettünk. A növényi mintákat folyékony nitrogénnel steril dörzsmozsarakban széttroncsoltuk. 600 µl Lysis Solution pufferrel a növényi szöveteket feltártuk. A feltárt sejteket 13500 rpm fordulaton 2 percig centrifugáltuk majd etanollal kicsaptuk. Ezután 1 perc 13500 rpm centrifugálást követően 400 µl mosó pufferrel tisztítottuk át a mintákat, háromszori ismétlésben. Az RNS-t 35 µl pufferben elálltuk. Az RNS koncentrációt Nanophotometer 2210 (Implen, Germany) típusú spektrofotométer használatával megmértük. Az izolált RNS-t felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.3 DNáz kezelés

A mintákat DNáz enzimmel kezeltük (DNase I, 1U/µl, Fermentas, Lithuania) a gyártó által megadott protokoll szerint. Az elegyet 37 °C-on 30 percig, 1 µl EDTA (50 mM, ThermoFisher Scientific, USA) hozzáadását követően 65 °C-on 10 percig inkubáltuk. A kezelést követően az RNS koncentrációt spektrofotométerrel (Nanophotometer 2210, Implen, Germany) határoztuk meg.

3.4 cDNS szintézis

A DNáz enzimmel kezelt, egységes koncentrációra (2000 ng / 20 µl cDNS szintézis reakció elegy) beállított mRNS reverz transzkripciója „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit”-tel (ThermoFisher Scientific, USA) (1. melléklet.) történt, a gyártó utasításai szerint. A cDNS szintézist az alábbiak szerint végeztük: A szintézis során steril 0,2 ml PCR csövekbe 4 µl cDNS szintézis mixet (5x Reaction Buffer), 1 µl reverz transzkriptáz enzimet (200 U/µl), 1 µl „RiboLock Rnase Inhibitor”-t (20 U/µl), 2 µl dNTP mixet (10 mM), 1 µl „Random Hexamer” primer-t és a koncentrációtól függő mennyiségű RNS-t és az RNS mennyiségétől függő 12-x µl (x: az RNS koncentrációjától függő mennyiség) steril desztillált vizet mértünk. A cDNS reakció elegy összterfogata 20 µl. Az elegyet a szintézishez Techne TC-412 (Burlington, USA) típusú PCR készülékben az alábbi hőprofil szerint kezeltük: 25 °C 5 perc, 42 °C 60 perc, 70 °C 5 perc. A szintetizált cDNS-t felhasználásig -20°C-on tároltuk (1. ábra).

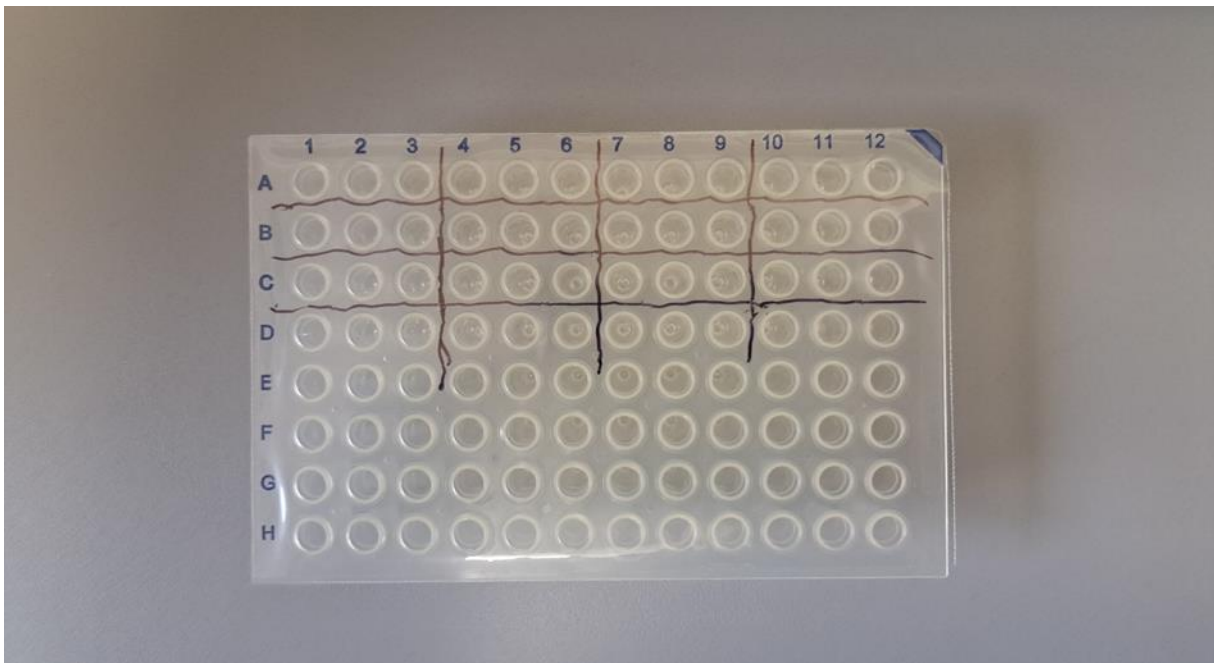


1. ábra: A szintetizált cDNS minták és qrtPCR-hez szükséges *forward* és *reverz* primerek
(Fotó: Gonda Attila, 2023)

3.5 Kvantitatív Real-time PCR

A kvantitatív valós idejű, qrtPCR termékek képződésének detektálását Stratagene Mx3000P QPCR rendszeren (Agilent Technologies) végeztük. Minden reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük, amely 12,5 µl SYBR Green Master Mix reagenst (Applied Biosystems), 1 µl cDNS mintát, 70 nM génspecifikus primert és 8 µl nukleáz-mentes vizet tartalmazott.

A Real-time PCR vizsgálat három ismétlésben, három darab PCR plate-en volt elvégezve, úgy, hogy az első négy teljes sorban az enzimek voltak pipettázva (A- *Eflα*, B- *APX*, C- *SOD*, D- *CAT*) A cDNS-ek pipettázása a következő sorrend szerint történt: 1.-3. Kontroll oltatlan cDNS/ 4.-6. Kontroll oltott cDNS/ 7.-9. Fertőzött cDNS/ 10.-12. Oltott és fertőzött cDNS (2. ábra). A paradicsomon végzett kísérlet során alkalmazott primerek szekvenciái (*SOD*, *CAT*, *APX*), valamint a konstitutívan expresszálódó kontrollként használt elongation factor 1-alpha (*Eflα*), primer szekvenciái a 1. táblázat-ban lettek feltüntetve.



2. ábra: Összeállított PCR, PCR plate-en (Fotó: Gonda Attila, 2023)

1. táblázat: A felhasznált primerek szekvenciái
(Forrás: Saját munka)

<i>Efla</i>	elongation factor 1-alpha	130	F: GATTGGTGGTATTGGAAGTGC R: AGCTTCGTGGTGCATCTC	NM_001247106.2
<i>SOD</i>	superoxide dismutase	115	F: GCTTACAATGGAGAACTCAAAGAA R: TGAGGCTCCAAAGCATCCAT	AY262025.1
<i>CAT</i>	catalase	122	F: TGCTCACCTTACCTGTGCTG R: AACCACGAGGATCCCTCAGA	KU933833.1
<i>APX</i>	ascorbate peroxidase	135	F: TGTGTCCGTACCTGAGGAGT R: GCCCCAGAAAGTGCAACAAT	AF413573.1

A hőprofilt az alábbiak szerint állítottuk be: 95 °C 15 perc, 40 ciklus 95 °C 15 másodperc, az indítoszekvenciák olvadási hőmérsékletétől függően 59 °C 30 másodperc és 72 °C 20 másodperc, végül 1 ciklus 95 °C 60 másodperc, 59 °C 30 másodperc és 95 °C 30 másodperc. Real-time PCR reakciót egy mintára azonos körülmények között, háromszori ismételtsben végeztük el. A paradicsom elongációs faktor génjét használtuk konstitutívan expresszáldó kontrollként. A kontroll gén expresszió minden egyes kísérletben mérhető volt, demonstrálva, hogy nem befolyásolják a kísérleti körülmények. A génexpressziókat a $\Delta\Delta CT$ módszerrel számoltuk (Livak és Schmittgen 2008).

3.5 Statisztikai értékelés

Az eredmények statisztikai elemzését R statisztikai környezetben (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria) végeztük. A csoportok összehasonlítását Tukey post hoc teszttel végeztük. Az ábrákon és táblázatokban feltüntetett értékek az átlagot $\pm$ standard hibát jelölik. A korreláció meglétét vagy hiányát n.s.: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ szignifikancia szinteken határoztuk meg.

4. Eredmények

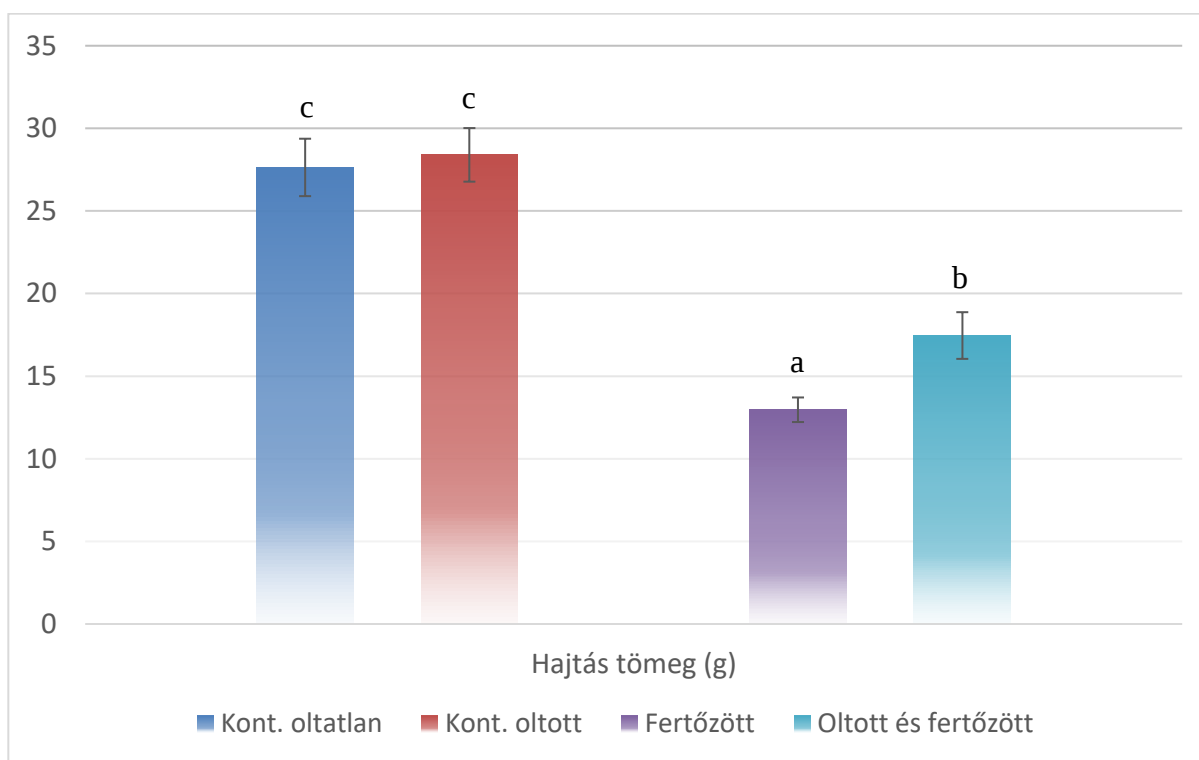
4.1 A vizsgált növények hajtás és gyökér tömeg változásai

A kezelések hatásainak pontosabb megértéséhez, előbb a kontroll és a fertőzött paradicsomok, hajtás és gyökér tömegei lettek összehasonlítva. Annak érdekében, hogy váltott ki esetleg hatást az arbuszkuláris mikorrhiza a növényekre. A kontroll és az uborka mozaik vírussal fertőzött növényeknél is mind az oltatlan kontroll és az arbuszkuláris mikorrhiza gombával oltott növények tömegei lettek átlagolva. A vett minták tömegeit a 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat: A vett növényi anyagok mért tömegei (g) *(Forrás: Saját munka.)*

	Hajtás tömeg (g)	Gyökér tömeg (g)
Vizsgált növények (16 db)		
Kontroll oltatlan	25,07 g	6,42 g
	28,1 g	7,48 g
	28,52 g	8,28 g
	28,85 g	8,28 g
Átlag	27,635 g	7,615 g
Kontroll oltott	27,82 g	8,05 g
	26,58 g	9,62 g
	28,75 g	8,87 g
	30,43 g	9,4 g
Átlag	28,395 g	8,985 g
Fertőzött	12,79 g	7,03 g
	13,48 g	6,54 g
	13,61 g	7,37 g
	11,99 g	5,05 g
Átlag	12,9675 g	6,4975 g
Oltott és fertőzött	16,2 g	8,45 g
	18,19 g	8,21 g
	16,36 g	7,18 g
	19,09 g	8,77 g
Átlag	17,46 g	8,1525 g

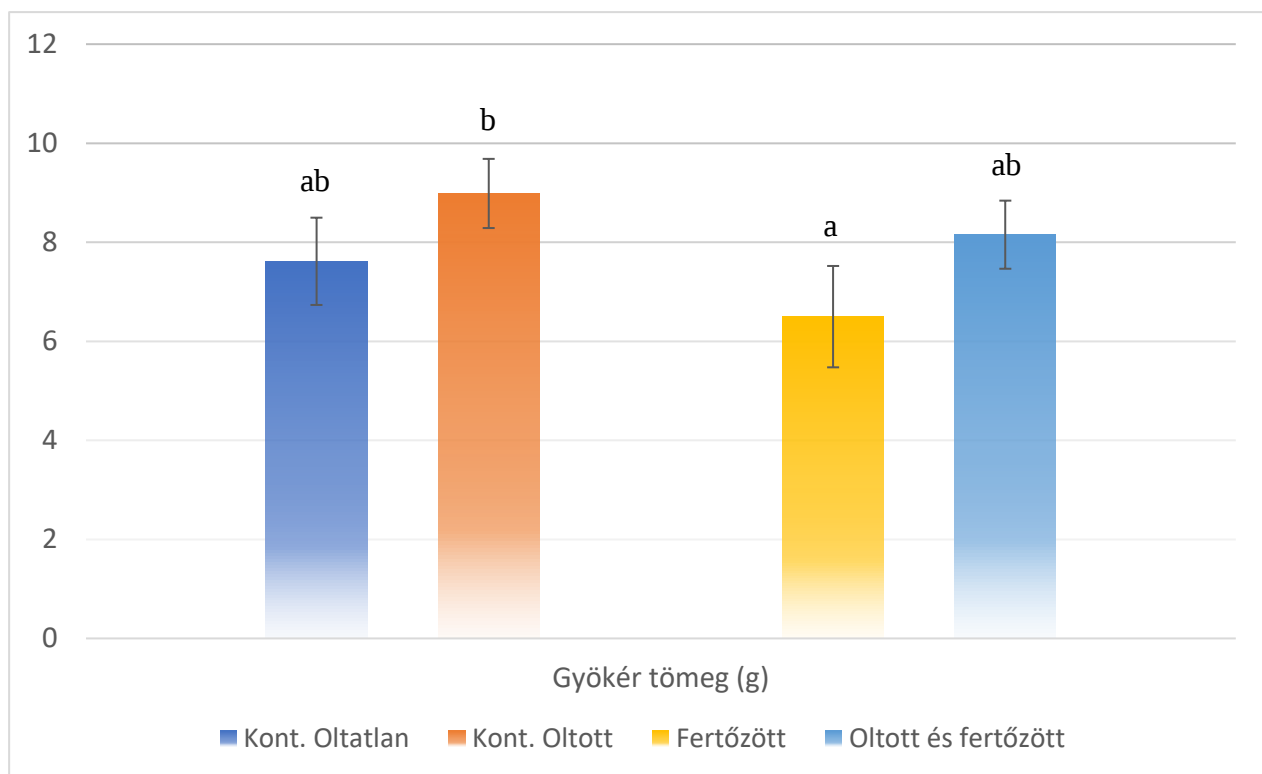
A kontroll oltatlan növények átlagos hajtás tömege (27,635 g) alacsonyabb volt, mint a kontroll oltott paradicsom növények átlagos hajtás tömege (28,395 g). Viszont szignifikáns különbség a kettő átlag között nem volt megfigyelhető. A mozaik vírussal fertőzött növények átlagos hajtás tömege (12,9675 g) szintén alacsonyabb volt, mint a mikorrhizával oltott és mozaik vírussal fertőzött növények hajtás tömege (17,46 g). Itt viszont megfigyelhető egy érték különbség az oltott és fertőzött növények javára. Az átlagos tömeg értékek itt térnek el a legnagyobb mértékben. Az átlagos hajtás tömeg értékeket a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A vizsgált paradicsom növények hajtás tömegeinek az átlaga

A gyökér tömeg értéknél is hasonló eredmény figyelhető meg. Az oltatlan növények átlagos tömegei itt is kisebb értéket mutatnak. A kontroll oltatlan növények átlagos gyökér tömege (7,615 g) alacsonyabb volt, mint az kontroll oltott paradicsom növények átlagos gyökér tömege (8,985 g). Szignifikáns különbség a kettő átlag között itt sem volt megfigyelhető.

A mozaik vírussal fertőzött növények átlagos gyökér tömege (6,4975 g) szintén alacsonyabb volt, mint a mikorrhizával oltott és mozaik vírussal fertőzött növények átlagos gyökér tömege (8,1525 g). Szignifikáns különbség itt sem volt megfigyelhető a kettő átlag között. Az átlagos gyökér tömeg értékeket a 4. ábra mutatja be.

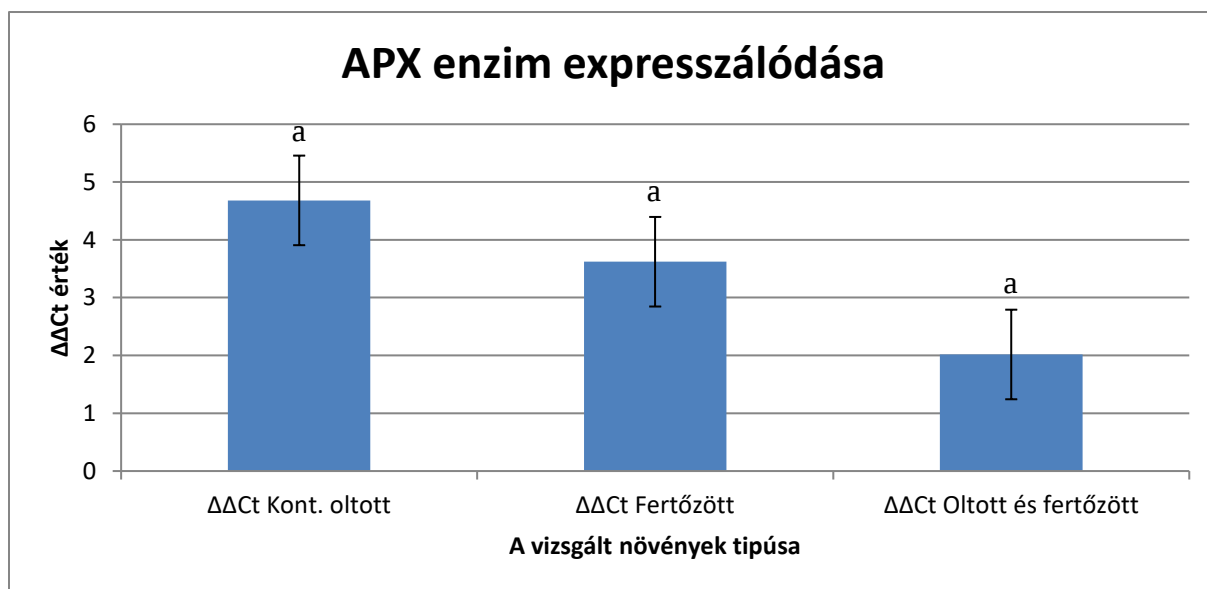


4. ábra: A vizsgált paradicsom növények gyökér tömegeinek az átlaga

4.2 A Kvantitatív Real-time PCR eredményei a vizsgált enzimekre

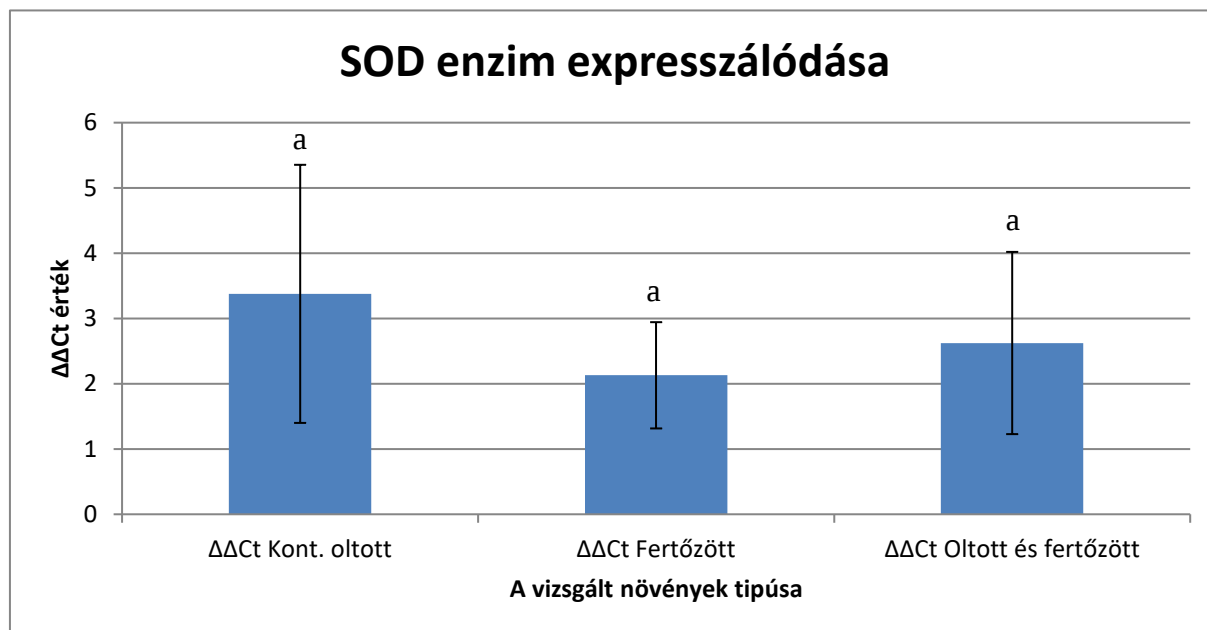
Az eredményeket megfigyelve összeségében elmondható, hogy mind az aszkorbát-peroxidáz (APX), a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és a kataláz (CAT) enzim is többszörösen expresszáldott a kezelések hatására. Mindegyik enzimnél a három ismétlésnél az $\Delta\Delta\text{Ct}$ érték 1 feletti értéket mutatott. A három ismétlés értékei átlagolva lettek és így kerültek összehasonlításra.

Az aszkorbát-peroxidáz (APX) enzim esetében elmondható, hogy átlagosan legjobban a mikorrhizával oltott kontroll növényen expresszáldott ($\Delta\Delta\text{Ct} = 4,68219$) a kontrollhoz képest. A mozaik vírussal fertőzött kontroll ($\Delta\Delta\text{Ct} = 3,62103$) és a beoltott és fertőzött paradicsom növény ($\Delta\Delta\text{Ct} = 2,01663$) génjei is többszörösen expresszáldtak, viszont a három átlagot összehasonlítva szignifikáns különbség nem figyelhető meg köztük. Az APX enzim expresszáldását az 5. ábra szemlélteti.



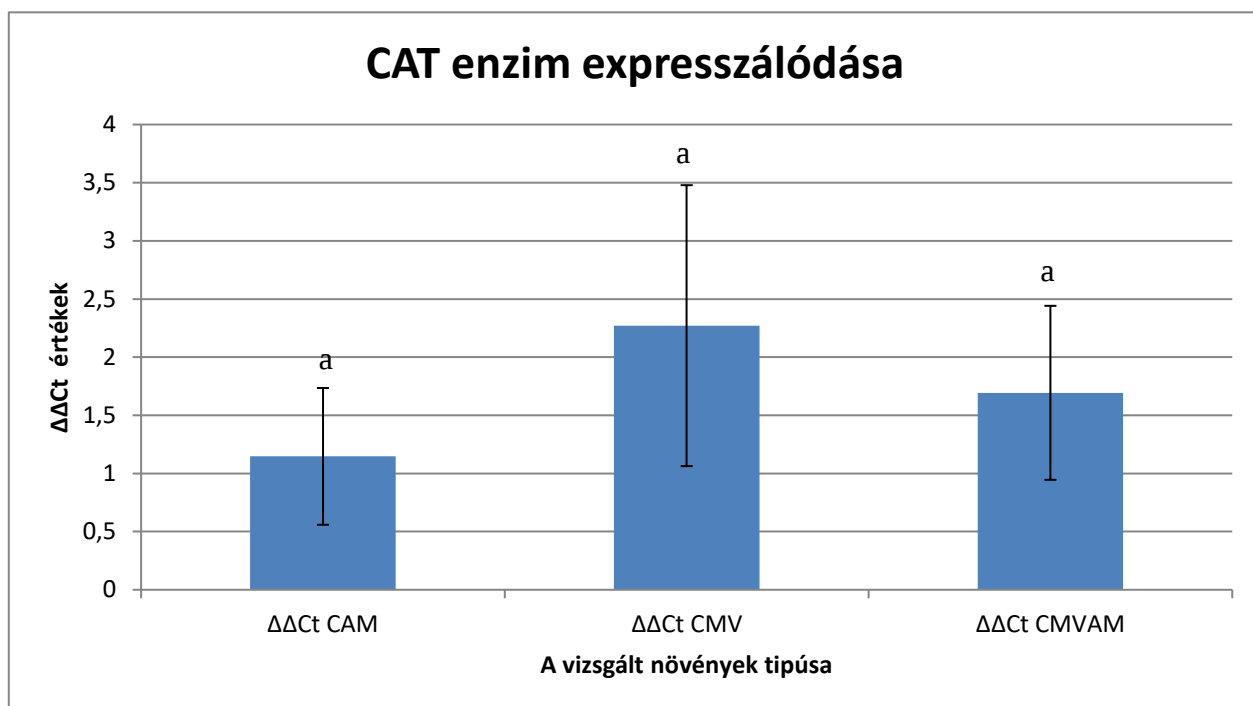
5. ábra: Az APX enzim expresszáldásának átlagos értékei

A szuperoxid-dizmutáz (SOD) esetében is elmondható, hogy a gén átlagosan legjobban a mikorrhizával oltott kontroll növényen expresszáldott ($\Delta\Delta\text{Ct} = 1,97718$) a kontrollhoz képest. A mozaik vírussal fertőzött kontroll ($\Delta\Delta\text{Ct} = 2,12926$) és a beoltott és fertőzött paradicsom növény ($\Delta\Delta\text{Ct} = 2,62379$) génjei is többszörösen expresszáldtak, viszont a három átlagos értéket összehasonlítva szignifikáns különbség itt sem figyelhető meg köztük. A SOD enzim expresszáldását a 6. ábra mutatja be.



6. ábra: A SOD enzim expresszáldásának átlagos értékei

A kataláz (CAT) enzimet megfigyelve az látszik, hogy a legnagyobb mértékben a fertőzött kontroll paradicsom növényeken expresszáldtak ($\Delta\Delta\text{Ct} = 2,270986$) átlagosan a kontrollhoz képest. Az arbuszkuláris mikorrhizával oltott növények ($\Delta\Delta\text{Ct} = 1,14693$) és a beoltott és fertőzött növények ($\Delta\Delta\text{Ct} = 1,683384$) átlagos gén kifejeződése is többszörös volt a kontrollhoz képest. A három expresszáldási értéket összehasonlítva azonban megfigyelhető, hogy még ha többszörösen is kifejeződtek, szignifikánsan a növények között nem lehet különbséget tenni. A CAT enzim expresszáldását a 7. ábra illusztrálja.



7. ábra: A CAT enzim expresszáldásának átlagos értékei

5. Következtetések és javaslatok

Kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy az arbuszkuláris mikorrhiza (*Funneliformis mosseae*) gomba milyen hatással volt az uborka mozaik vírussal (*Cucumber mosaic virus – CMV*) fertőzött, paradicsom (*Solanum lycopersicum* L.) var. Moneymaker fajtákra, hogy a növények milyen választ adtak a vírusos stresszre. A kezelések pontosabb megértése érdekében a kezelt növényekből hajtás és gyökér minták mellett DNS minta is készült.

A kutatás során a szuperoxid-dizmutáz, kataláz és peroxidáz gének biotikus stressz hatására bekövetkező változásait követtük nyomon paradicsom növények. A vizsgálatok során megfigyeltük, hogy a stressz hatására a nem mikorrhizált növényekben nagyobb mértékben aktivizálódnak a védekezési anyagok.

A génexpresszió vizsgálatok azt mutatták, hogy a peroxidáz gén stresszhelyzetben bekövetkező kifejeződése alacsonyabb volt a mikorrhizált mintáknál, biotikus stressz esetén. A diagramokon jól látható, hogy a mikorrhizált növényekben alacsonyabb volt a növényi védekezésben szerepet játszó gének expressziója a stresszmentes körülmények között, ami azt sugallja, hogy a mikorrhiza gomba előzetesen érzékenyíti a növényi védekező rendszert.

Összeségében megállítható, hogy az arbuszkuláris mikorrhizával való kezelés, uborka mozaik vírussal fertőzött paradicsom növényeken a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim kifejeződésében segített a legjobban. Ezáltal segítve a paradicsom növények stressztűrését.

Ugyanakkor mivel nem volt kimutathatóan szignifikáns különbség. Későbbi kutatások során érdemes lehet több faktor figyelembevételével, egy szélesebb körű vizsgálatot is lefolytatni dolgozatban leírt kísérlet beállítással. A kapott eredményeink tendenciáján látható, hogy az arbuszkuláris mikorrhiza gomba-növény kapcsolatrendszerben a gomba segíti a növény védekező rendszerét, érzékenyíti a növény védelmi reakcióit a biotikus stressz hatásokkal szemben.

6. Összefoglalás

A paradicsom Magyarország legfontosabb kertészeti növénye; gazdaságos termesztésében kiemelt szerepe van az integrált védekezésnek. Az arbuszkuláris mikorrhiza gombáknak a biológiai védekezésbe történő beillesztését már több növénynél, így a paradicsomnál is tesztelték. Alkalmazásukkal elősegíthetjük a növények fejlődését, tápelemfelvételét és a különböző stressz hatások tompításában is nagy szerepet játszanak. Munkánk célja volt, hogy a paradicsom eredményeink alapján megállapítható, hogy a mikorrhiza gombák részt vesznek a stressz hatás erősségének a csökkentésében, melyet a stressz enzim aktivitások befolyásolásával érnek el.

A növényi védekezési reakció számos lépcsőben zajlik. Ebben a folyamatban az egyik fontos elem a stressz hatására felszabaduló reaktív oxigénformák eltávolításában szerepet játszó enzimek. Az arbuszkuláris mikorrhiza gomba, hasonlóan a patogén gombákhoz, aktiválja a növény védelmi rendszerét, ami előzetesen érzékenyíti azt a stresszhatásokkal szemben. Ennek eredményeként a mikorrhizált növények képesek gyorsabban reagálni a stresszre, és alacsonyabb enzimaktivitást mutatnak a nem mikorrhizált növényekhez képest.

A hajtás tömegek eredményeit figyelembe véve elmondható, hogy a kezelés hatására a mikorrhizával beoltott növények átlagos tömege nőtt a kontrollokhoz képest. Az oltatlan és oltott kontrollok között nem mutatkozott szignifikáns különbség, viszont a szórás értékek csökkentek. Ez alapján feltételezhető egy tendencia, amely egy jobb stressztűrést hordozhat magában. A vírussal fertőzött kontroll és a fertőzött és mikorrhizával beoltott növényeknél különbség mutatkozott a beoltott és fertőzött növények között. Az utóbbi csoport magasabb hajtástömeg biomassza tömeget produkált ugyanazon tenyésztési idő alatt.

A gyökér tömeg értékeket megvizsgálva azt látni itt is, akár csak a hajtás tömeg vizsgálatoknál, hogy a mikorrhizával beoltott paradicsom növények átlagos tömege, a kezelés hatására megnőtt. Az oltatlan és oltott kontrollok között szignifikáns különbség nem mutatkozott, viszont a szórás érték csökkent. Hasonlóan a fertőzött kontroll és a fertőzött és beoltott növények tömegei között statisztikailag igazolható különbség nem volt, de a szórás értékek itt is csökkentek. Ezek alapján itt is feltételezhető a jobb stressztűrés.

Elmondható, hogy a mikorrhizával történő oltás hatására a $\Delta\Delta Ct$ értékek nagy számú enzim expresszáldást mutatnak mindegyik növénynél a kontrollhoz képest. Ez arra utalhat, hogy az uborka mozaik vírus által okozott stresszhelyzetben a megfigyelt gének magasabb szinten

fejeződtek ki, ezáltal hatékonyabban tudott az adott növény a stresszhelyzetre reagálni, és enyhíteni azt. Átlagosan figyelembe véve az enzimeket, legkifejezőbben a szuperoxid-dizmutáz (SOD) expresszáldott a mikorrhizával beoltott és mozaik vírussal fertőzött növényekben. Szignifikáns különbség viszont a többi növénnyel együtt figyelembe véve nem volt erre az enzimre tekintettel.

Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az arbuszkuláris mikorrhiza gomba pozitív hatással van a növény védelmi rendszerére, elősegítve azt, hogy a növény hatékonyabban reagáljon különböző stresszhatásokra. Az enzim- és génvizsgálatok eredményei támogatják azt a feltételezést, hogy a mikorrhiza gomba-növény kapcsolatrendszer elősegíti a növényi védekezési mechanizmusok kialakulását és optimalizálását a stresszhelyzetekre való gyorsabb válasz érdekében.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani konzulensemnek Dr. Mayer Zoltánnak, a Genetika és Biotechnológia Intézet (és jogelődjeinek) dolgozóinak, barátaimnak és családtagjaimnak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy a diplomadolgozatom megírása zökkenőmentesen mehessen végbe.

8. Irodalomjegyzék

1. Atkinson, N. J. & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
2. Azevedo Neto, A. D., Gomes-Filho, E., Prisco, J. T. (2008). Salinity and oxidative stress. Abiotic stress and plant responses'. (Eds NA Khan, S Sarvajeet) pp. 58-82.
3. Bastías, D. A., Johnson, L. J., & Card, S. D. (2020). Symbiotic bacteria of plant-associated fungi: friends or foes? In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 56, pp. 1–8). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.10.010>
4. Bebbber, D. P. & Gurr, S. J. (2015). Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62-64.
5. Cameron, D.D.; Neal, A.L.; Van Wees, S.A.; Ton, J. Mycorrhiza-induced resistance: More than the sum of its parts? *Trends Plant. Sci.* 2013, 18, 539–545.
6. Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Fall, D., Hoher, V., & Svistoonoff, S. (2020). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: importance in biotic and abiotic stressed regulation. In *Diversity* (Vol. 12, Issue 10, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/d12100370>
7. Dowarah, B., Gill, S. S., & Agarwala, N. (2022). Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Conferring Tolerance to Biotic Stresses in Plants. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 41, Issue 4, pp. 1429–1444). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10392-5>
8. Frattini, A., Martínez-Solís, M., Llopis-Giménez, Á., Pozo, M. J., Rivero, J., Crava, C. M., & Herrero, S. (2022). Compatibility of mycorrhiza-induced resistance with viral and bacterial entomopathogens in the control of *Spodoptera exigua* in tomato. *Pest Management Science*, 78(10), 4388–4396. <https://doi.org/10.1002/ps.7058>
9. Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjær, M. F., Thordal-Christensen, H., & Pons-Kühnemann, J. (2006). Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*, 16(6), 413–419. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0051-z>
10. Hashem, A., Akhter, A., Alqarawi, A. A., Singh, G., Almutairi, K. F., & Abd_Allah, E. F. (2021). Mycorrhizal fungi induced activation of tomato defense system mitigates *Fusarium* wilt stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5442–5450. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.025>
11. Hawksworth DL 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude significance, and conservation. *Mycol Res* 95: 641– 655.
12. Hawksworth DL 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105: 1422– 1432.
13. HELYES L. (1999): A paradicsom és termesztése – SYCA Szakkönyvszolgálat, Budapest - 21-79. p
14. Larcher, W. (1987). Stress bei pflanzen. *Naturwissenschaften*, 74(4), 158-167.
15. Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Aoki, T., Ariyawansa, H. A., Cardinali, G., Crous, P. W., Druzhinina, I. S., Geiser, D. M., Hawksworth, D. L., Hyde, K. D., Irinyi, L., Jeewon, R., Johnston, P. R.,

- Kirk, P. M., Malosso, E., May, T. W., Meyer, W., ... Schoch, C. L. (2021). Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. In *Nature Microbiology* (Vol. 6, Issue 5, pp. 540–548). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00888-x>
16. Manickavelu, A., Kawaura, K., Oishi, K., Shin-I, T., Kohara, Y., Yahiaoui, N., Keller, B., Suzuki, A., Yano, K., Ogihara, Y. (2010). Comparative gene expression analysis of susceptible and resistant near-isogenic lines in common wheat infected by *Puccinia triticina*. *DNA research*, 17(4), 211-222.
 17. Meitha, K., Pramesti, Y., & Suhandono, S. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Postharvest Vegetables and Fruits. In *International Journal of Food Science* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/8817778>
 18. Miozzi, L., Vaira, A. M., Brilli, F., Casarin, V., Berti, M., Ferrandino, A., Nerva, L., Nerva, L., Accotto, G. P., & Lanfranco, L. (2020). Arbuscular mycorrhizal symbiosis primes tolerance to cucumber mosaic virus in tomato. *Viruses*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/v12060675>
 19. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
 20. Molazem, D. & Azimi, J. (2015). Morpho-physiological characterization in eight varieties of maize (*Zea mays* L.) under soil salinity. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(6).
 21. Nawkar, G., Maibam, P., Park, J., Sahi, V., Lee, S., Kang, C. (2013). UV-induced cell death in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 1608-1628.
 22. R Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020, Available online: <https://www.r-project.org/>
 23. Sachdev, S., Baudh, K., & Singh, R. P. (2023). Native Rhizospheric Microbes Mediated Management of Biotic Stress and Growth Promotion of Tomato. *Sustainability (Switzerland)*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/su15010593>
 24. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3(6):1101-1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
 25. Sepehri, A. & Golparvar, A. R. (2011). The effect of drought stress on water relations, chlorophyll content and leaf area in canola cultivars (*Brassica napus* L.). *Electronic Journal of Biology*, 7, 49-53.
 26. Spagnoletti, F.N.; Cornero, M.; Chiocchio, V.; Lavado, R.S.; Roberts, I.N. Arbuscular mycorrhiza protects soybean plants against *Macrophomina phaseolina* even under nitrogen fertilization. *Eur. J. Plant. Pathol.* 2020, 156, 839–849.
 27. Vos, C.; Tesfahun, A.; Panis, B.; De Waele, D.; Elsen, A. Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Appl. Soil Ecol.* 2012, 61, 1–6.
 28. Zhu, B., Gao, T., Zhang, D., Ding, K., Li, C., & Ma, F. (2022). Functions of arbuscular mycorrhizal fungi in horticultural crops. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 303). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111219>

Online források:

HTTP1: https://www.tomatonews.com/en/worldwide-total-fresh-tomato-production-exceeds-187-million-tonnes-in-2020_2_1565.html

HTTP2: <http://oftermelo.com/a-paradicsom-termesztese-es-intenziv-hajtatasa>

HTTP3: <https://www.nak.hu/tajekoztatasi-szolgalatasi/mezogazdasagi-termeles/105189-frisspiaci-paradicsom-vilagpiacanak-alakulasa-a-2022-es-oszi-es-teli-szezonban>

HTTP4: http://real-d.mtak.hu/1034/1/dc_1369_16_tezisek.pdf

9. Táblázatok és ábrák jegyzéke

- 1. ábra:** A szintetizált cDNS minták és qrtPCR-hez szükséges *forward* és *reverz* primerek – 15. oldal
- 2. ábra:** Összeállított PCR, PCR plate-en – 16. oldal
- 1. táblázat:** A felhasznált primerek szekvenciái – 17. oldal
- 2. táblázat:** A vett növényi anyagok mért tömegei (g) – 18. oldal
- 3. ábra:** A vizsgált paradicsom növények hajtás tömegeinek az átlaga – 19. oldal
- 4. ábra:** A vizsgált paradicsom növények gyökér tömegeinek az átlaga – 20. oldal
- 5. ábra:** Az APX enzim expresszáldásának átlagos értékei – 21. oldal
- 6. ábra:** A SOD enzim expresszáldásának átlagos értékei – 22. oldal
- 7. ábra:** A CAT enzim expresszáldásának átlagos értékei – 23. oldal

10. Melléklet

CONTROL REACTIONS

Positive and negative control reactions should be used to verify the results of the first strand cDNA synthesis steps.

- **Reverse transcriptase minus (RT-) negative control** is important in RT-PCR or RT-qPCR reactions to assess for genomic DNA contamination of the RNA sample. The control RT- reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for the RT enzyme.
- **No template negative control (NTC)** is important to assess for reagent contamination. The NTC reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for RNA template.
- **Positive control** RNA template and gene-specific primers are supplied with the kit. The human GAPDH control RNA (1.3 kb) was produced by *in vitro* transcription. The GAPDH-specific control PCR primers are designed to be complementary to human, mouse and rat GAPDH genes and generate 496 bp RT-PCR product. The protocol for the positive control RT-PCR is provided below.

I. Control first strand cDNA synthesis reaction

Mix and briefly centrifuge all components after thawing, keep on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Control GAPDH RNA (50 ng/μL)	2 μL
Oligo (dT) ₁₈ Primer or Random Hexamer Primer or Reverse GAPDH Primer	1 μL
5X Reaction Buffer	4 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
RevertAid RT (200 U/μL)	1 μL
Water, nuclease-free	9 μL
Total volume	20 μL

2. Mix gently and centrifuge.
3. For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C. For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C.
4. Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.
5. Briefly centrifuge and proceed with control PCR amplification.

II. Control PCR amplification

1. Dilute the cDNA generated with the control first strand cDNA reaction 1:1000 in Water, nuclease-free.
2. Gently vortex and briefly centrifuge all PCR reagents after thawing.
3. Place a thin-walled PCR tube on ice and add the following reagents:

cDNA from control RT reaction (1:1000 dilution)	2 μL
10X PCR buffer	5 μL
10 mM dNTP Mix	1 μL (0.2 mM each)
25 mM MgCl ₂	3 μL
Forward GAPDH Primer	1.5 μL
Reverse GAPDH Primer	1.5 μL
Taq DNA polymerase (5 U/μL)	0.5 μL
Water, nuclease-free	35.5 μL
Total volume	50 μL

4. Perform PCR in a thermal cycler with a heated lid or overlay with 25 μL of mineral oil.

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
Initial denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	30 s	35
Annealing	58	30 s	
Extension	72	45 s	

5. Load 5-10 μL of the RT-PCR product on 1% agarose gel. A distinct 496 bp PCR product should be visible after ethidium bromide staining.

Reference

1. Wiame, L., et al., Irreversible heat inactivation of DNaseI without RNA degradation, BioTechniques, 29, 252-256, 2000.

TROUBLESHOOTING

Low yield or no RT-PCR product

Degraded RNA template.

RNA purity and integrity is essential for synthesis of full-length cDNA. Always assess the integrity of RNA prior to cDNA synthesis. Sharp 18S and 28S RNA bands should be visible after denaturing agarose gel electrophoresis of total eukaryotic RNA. Follow general recommendations to avoid RNase contamination.

Low template purity.

Trace amounts of agents used in RNA purification protocols may remain in solution and inhibit first strand synthesis, e.g., SDS, EDTA, guanidine salts, phosphate, pyrophosphate, polyamines, spermidine. To remove trace contaminants, re-precipitate the RNA with ethanol and wash the pellet with 75% ethanol.

Insufficient template quantity.

Increase the amount of template to the recommended level. Following DNase I treatment, terminate the reaction by heat inactivation in the presence of EDTA (to bind magnesium ions), RNA hydrolyzes during heating in the absence of a chelating agent (1).

Incorrect primer choice.

Use the correct primer for the RNA template. Use the random hexamer primer instead of the oligo(dT)₁₈ primer with bacterial RNA or RNA without a poly(A) tail. Ensure sequence-specific primers are complementary to 3'-end of the template RNA.

GC rich template.

If the RNA template is GC rich or is known to contain secondary structures, increase the temperature of the reverse transcription reaction up to 45°C.

RT-PCR product longer than expected

RNA template is contaminated with DNA.

Amplification of genomic DNA containing introns. Perform DNase I digestion prior reverse transcription. To avoid amplification of genomic DNA, design PCR primers on exon-intron boundaries.

RT-PCR product in negative control

RNA template is contaminated with DNA.

PCR product in the negative control (RT-) indicates the reaction is contaminated with DNA. Perform DNase I digestion prior reverse transcription.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.thermoscientific.com/onebio for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2013 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.



PRODUCT INFORMATION

Thermo Scientific

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

#K1622 100 rxns

Lot _____ Expiry Date _____

Store at -20°C



www.thermoscientific.com/onebio

COMPONENTS OF THE KIT

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	#K1621	#K1622
RevertAid RT (200 U/μL)	25 μL	120 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	25 μL	120 μL
5X Reaction Buffer		
250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	150 μL	500 μL
10 mM dNTP Mix	50 μL	250 μL
Oligo(dT) ₁₈ Primer, 100 μM	25 μL	120 μL
Random Hexamer Primer, 100 μM	25 μL	120 μL
Forward GAPDH Primer, 10 μM	20 μL	20 μL
Reverse GAPDH Primer, 10 μM	20 μL	20 μL
Control GAPDH RNA, 0.05 μg/μL	20 μL	20 μL
Water, nuclease-free	2 × 1.25 mL	2 × 1.25 mL

CERTIFICATE OF ANALYSIS

RT-PCR using 100 fg of control GAPDH RNA and control primers generated a prominent 496 bp product on 1% agarose gel after ethidium bromide staining.

Quality authorized by: Jurgita Zilinskiene

DESCRIPTION

The Thermo Scientific™ RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit is a complete system for efficient synthesis of first strand cDNA from mRNA or total RNA templates. The kit uses RevertAid Reverse Transcriptase (RT), which has lower RNase H activity compared to AMV reverse transcriptase. The enzyme maintains activity at 42-50°C and is suitable for synthesis of cDNA up to 13 kb.

The recombinant Thermo Scientific™ RiboLock™ RNase Inhibitor, supplied with the kit, effectively protects RNA from degradation at temperatures up to 55°C.

First strand cDNA synthesized with this system can be directly used as a template in PCR or real-time PCR. It is also ideal for second strand cDNA synthesis or linear RNA amplification. Radioactively and non-radioactively labeled nucleotides can be incorporated into first strand cDNA for use as a probe in hybridization experiments, including microarrays.

STORAGE

All components of the kit should be stored at -20°C. Keep control RNA at -70°C for longer storage.

IMPORTANT NOTES

Avoiding ribonuclease contamination

RNA purity and integrity are essential for synthesis of full-length cDNA. RNA can be degraded by RNase A, which is a highly stable contaminant found in any laboratory environment.

General recommendations to avoid RNase contamination:

- DEPC-treat all tubes and pipette tips to be used in cDNA synthesis or use certified nuclease-free labware.
- Wear gloves when handling RNA and all reagents, as skin is a common source of RNases. Change gloves frequently.
- Use RNase-free reagents, including high quality water (e.g., Water, nuclease-free, #R0581).
- Use RiboLock™ RNase Inhibitor (provided with the kit) to protect RNA from the activity of RNases.
- Keep all kit components tightly sealed when not in use. Keep all tubes tightly closed during the reverse transcription reaction.

Template RNA

Total cellular RNA isolated by standard methods is suitable for use with the kit. Purified RNA must be free of salts, metal ions, ethanol and phenol to avoid inhibiting the cDNA synthesis reaction. Trace contaminants can be removed by ethanol precipitation of the RNA followed by two washes of the pellet with cold 75% ethanol. For RT-PCR applications, template RNA must be free of DNA contamination. Prior to cDNA synthesis, RNA can be treated with DNase I, RNase-free (#EN0521) to remove trace amounts of DNA. Always perform a control (RT-) reaction which includes all components for RT-PCR except for the reverse transcriptase enzyme.

Removal of genomic DNA from RNA preparations

1. Add to an RNase-free tube:

RNA	1 μg
10X Reaction Buffer with MgCl ₂	1 μL
DNase I, RNase-free (#EN0521)*	1 μL (1U)
Water, nuclease-free	to 10 μL

* Do not use more than 1 U of DNase I, RNase-free per 1 μg of RNA.

2. Incubate at 37°C for 30 min.

3. Add 1 μL 50 mM EDTA and incubate at 65°C for 10 min. RNA hydrolyzes during heating with divalent cations in the absence of a chelating agent (1).

Alternatively, use phenol/chloroform extraction.

4. Use the prepared RNA as a template for reverse transcription.

RNA sample quality

Assess RNA integrity prior to cDNA synthesis. The most common method is denaturing agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining. If both 18S and 28S rRNA appear as sharp bands after electrophoresis of total eukaryotic RNA, the RNA is considered to be intact. The 28S rRNA band should be approximately twice as intense as the 18S rRNA. Any smearing of rRNA bands is an indication of degraded mRNA. If this occurs, a new sample of total RNA should be prepared.

RNA quantity

- Use 0.1 ng - 5 μg of total RNA or 1 ng - 500 ng of poly(A) mRNA to generate first strand cDNA as the initial step of a two-step RT-PCR protocol.
- Use 1 μg of isolated mRNA to generate first strand cDNA for second-strand synthesis and subsequent cloning reactions.

PROTOCOLS

I. First Strand cDNA Synthesis

After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Template RNA	total RNA or poly(A) mRNA or specific RNA	0.1 ng - 5 μg 10 pg - 0.5 μg 0.01 pg - 0.5 μg
Primer	Oligo (dT) ₁₈ primer or Random Hexamer primer or gene-specific primer	1 μL 1 μL 15-20 pmol
Water, nuclease-free		to 12 μL
Total volume		12 μL

2. *Optional.* If the RNA template is GC-rich or contains secondary structures, mix gently, centrifuge briefly and incubate at 65°C for 5 min. Chill on ice, spin down and place the vial back on ice.

3. Add the following components in the indicated order:

5X Reaction Buffer	4 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/μL)	1 μL
Total volume	20 μL

4. Mix gently and centrifuge briefly.
5. For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C. For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C. **Note:** For GC-rich RNA templates the reaction temperature can be increased up to 45°C.
6. Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.

The reverse transcription reaction product can be directly used in PCR applications or stored at -20°C for less than one week. For longer storage, -70°C is recommended.

II. PCR Amplification of First Strand cDNA

The product of the first strand cDNA synthesis can be used directly in PCR or qPCR. The volume of first strand cDNA synthesis reaction mixture should not comprise more than 1/10 of the total PCR reaction volume. Normally, 2 μL of the first strand cDNA synthesis reaction mixture is used as template for subsequent PCR in 50 μL total volume.

(Continued on reverse page)

1. melléklet: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit protokollja

NYILATKOZAT

Dr. Mayer Zoltán (hallgató Neptun azonosítója: QML9L9) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot¹ áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom².

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*3}

Kelt: Gödöllő 2023. október 30.


belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Gonda Attila
A Hallgató Neptun kódja:	QML9L9
A dolgozat címe:	Mikorrhiza gomba hatása paradicsom növény környezeti tényezőkre adott stressz-válaszaira
A megjelenés éve:	2023
A konzulens intézetének neve:	Genetikai és Biotechnológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Mikrobiológia és Alkalmazott Biotechnológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

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

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

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

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitóri rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

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

Kelt: Gödöllő, 2023 év október hó 30. nap


Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törölendő.