

SZAKDOLGOZAT

Poór Kristóf

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Genetika és Biotechnológiai Intézet
Növénygenetika és növénynemesítés szakirányú
továbbképzési szak

Marker alapú szelekció a narancssárga fejeskáposzta
előállításában

Belső konzulens:	Tóth-Lencsés Andrea Kitty egyetemi adjunktus
Belső konzulens intézete/tanszéke:	Genetika és Biotechnológiai Intézet, Genetika és Genomika Tanszék
Külső konzulens:	Dr. Galli Zsolt, Czinege Dóra Növénynemesítő, Syngenta Kft.
Készítette:	Poór Kristóf

Gödöllő
2023

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	2
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1 A káposztafélék termesztése és genetikai sajátosságai	5
2.1.1 A káposztafélék termesztése és rendszertana	5
2.1.2 A káposztafélék genetikai sajátosságai	6
2.2 A karotinodiok	8
2.2.1 A karotinodiok jellemzése	8
2.2.2 Bioszintetikus út a karotinoidkhoz	9
2.2.3 A karotinodiok és a humán egészség	10
2.3 A kínai kel (<i>Brassica rapa L. ssp. pekinensis</i>) narancssárga mutációja	11
2.4 A molekuláris markerek és a marker asszisztált szelekció	13
2.5 A polimeráz láncreakció	15
3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK	18
3.1 Felhasznált növényanyag	18
3.2 A DNS izolálás	20
3.3 A PCR körülmények és reakciók	22
3.3.1 A primerpárok	22
3.3.2 A Gradients- és Touchdown-PCR reakciók.....	24
3.4 Agaróz gélelektroforézis.....	29
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	31
4.1. Az izolált DNS koncentrációk.....	31
4.2 A Gradients-PCR reakciók eredményei.....	32
4.3 A COS primerpárok Touchdown-PCR eredményei	34
4.5 A BraOR és BolCRTISO primerpárok Touchdown-PCR eredményei	41
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	46
6. ÖSSZEFOGLALÁS	49
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	50
8. IRODALOMJEGYZÉK	51
9. MELLÉKLETEK	57

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Bolygónk népességének folyamatos növekedése óriási elvárásokat támaszt a növénynemesítők irányába. A harmadik világ országaiban alapvető probléma a minőségi táplálkozás, a szervezet számára kielégítő tápelemek bevitele. A probléma enyhítésére az egyik legismertebb példa a β -karotin termelő rizs géntechnológiai úton való létrehozása.

Továbbá a fejlődő országok piacai is hatalmas potenciált hordoznak az új, táplálódóbb fajták tekintetében, ahol az egészséges életmód és ehhez kapcsolódóan a magas beltartalmi értékekkel bíró feldolgozatlan élelmiszerek fogyasztása kiemelt jelentőségű. A felvázolt piacokon alapvető elvárás, hogy az új fajták előállítása a konvencionális nemesítés útján történjen, melynek társadalmi, és politikai támogatottsága jóval nagyobb, szemben a genomszerkesztés és a géntechnológiai módosítás eszközeivel.

Galli Zsolt növénynemesítő egy olyan fejeskáposzta (*B. oleracea* – CC genom) létrehozását tűzte ki célul a hagyományos nemesítés útján, amelynek belső leveleiben β -karotin halmozódik fel. A globális termesztést tekintve a káposztafélék 10%-os részesedéssel a harmadik helyet foglalják el a zöldségnövények között.

A növényekben leggyakrabban előforduló festékanyagok a karotinoidok. A karotinoidok felelősek az élénksárga, narancssárga és piros szín kialakulásáért. A β -karotin szervezetünk számára nélkülözhetetlen molekula, egészségmegőrző szerepe bizonyított a szív- és érrendszeri betegségek megelőzésében. Valamint zsírolékony molekula, így az étrendkiegészítők túlzott fogyasztásával könnyen túlléphetjük a szükséges mennyiséget.

A levelekben történő β -karotin felhalmozás további, nem kevésbé jelentős hozadéka a színváltozás. A zöldségek színei, formái és illatanyagai nagy mértékben befolyásolják a vásárlói szokásokat. Az újdonság, a megszokottól eltérő szín komoly előnyt jelenthet a piaci bevezetést tekintve.

Karfiolban (*B. oleracea* – CC genom) korábban már azonosítottak egy a β -karotin felhalmozáshoz, azaz narancsszínhez vezető mutációt (Crisp et al. 1975). Egyszerű megoldásnak tűnt a mutációt hordozó karfiollal történő keresztezés a genomok egyezése miatt. Az így végrehajtott keresztezések azonban nem vezettek a kívánt tulajdonsághoz, ugyan történt karotinoid felhalmozódás, viszont ez csak a gazdaságilag kevésbé fontos növényi részeket érintette. Azaz a levelekben csekély, míg a torzsában nagy mennyiségű karotinoid felhalmozódás volt megfigyelhető.

A karfiollal történő sikertelen keresztezéseket követően az új nemesítési alapanyagot a recesszív narancs gént hordozó kínai kel (*B. rapa* – AA genom) jelentette. A narancs mutációval rendelkező kínai kel belső leveleiben a normál változathoz képest akár kétszer annyi karotinoidot halmoz fel, valamint karotinoid összetétele is kedvezőbb az emberi szervezet számára. Azonban ez a megközelítés a konvencionális nemesítés szempontjából jóval nagyobb kiírást jelent, a kínai kel (*B. rapa* – AA genom) és fejeskáposzta (*B. oleracea* – CC genom) genomok különbözősége miatt.

A több éve zajló nemesítési program során keresztezéssel sikerült létrehozni egy narancs kínai kel (AA) - karalábé (CC) F1 hibridet (AC), ami hímsterilnek bizonyult (Szűcs 2015). Négy év után a vegetatív szaporítással fenntartott növényen megjelent egy fertilis oldalhajtás, amely öntermékenyítésével létrehoztak egy fertilis F2 (AACC) szegregálódó populációt (AACC) (Pongrácz 2021).

Azt ezt követő években kijelölt keresztezések során, a meglévő növényanyagot felhasználva újabb hibrideket hoztak létre. A növények kiválasztása, a szelekció a további keresztezésbe vonáshoz molekuláris markerek segítségével történt. A narancs mutáns gén jelenlétét Bra-OR és BolCRTISO1 primer párral elemezhetjük. A genomösszetétel megállapításában pedig COS (Conserved Ortholog Set) markerek segítenek, amelyek A és C genom specifikus fragmentumot szaporítanak fel. Ezt a munkát a flow citometriás mérés is támogatja.

Célkitűzéseim közt szerepelt a COS (Conserved Ortholog Set) markerek PCR protokolljának optimalizálása. A PCR reakciók során nem specifikus fragmentumok is felszaporodhatnak, amelyek megnehezítik a pontos kiértékelést. A PCR körülmények leginkább kritikus pontja a tapadási hőmérsékletek megválasztása, ezzel csökkenthetjük a nem specifikus fragmentumok felszaporodásának lehetőségét. A

primer párok megfelelő tapadási hőmérsékletének meghatározására gradiens PCR-t használtunk.

Valamint szükséges volt a már meglévő narancssárga szín markereinek tesztelésére az újabb növényanyagok esetén, hogy megállapítsuk, a kívánt gént hordozzák-e vagy sem. Emellett a COS markerekkel vizsgáltuk az új hibrideket a kontroll növények mellett, amely eredmények alapján megállapítható, hogy A vagy C genomra jellemző fragmentum jelenik-e meg.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A káposztafélék termesztése és genetikai sajátosságai

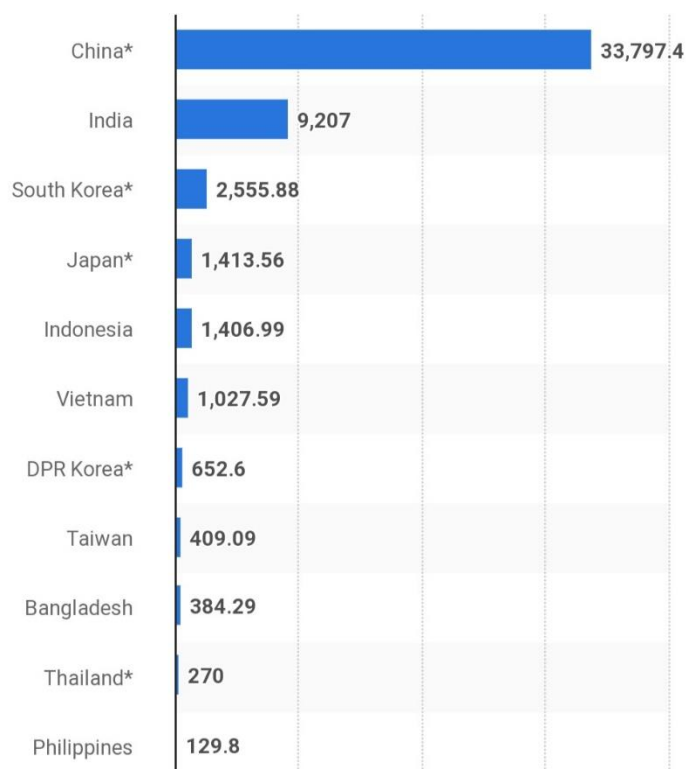
2.1.1 A káposztafélék termesztése és rendszertana

A *Brassicaceae* családba tartozó *Brassica* fajok a humán táplálkozás szempontjából nagy jelentőséggel bírnak, mint zöldség- és olajnövények (Prakash et al. 2009). Számszerűsítve a világ zöldségtermesztésének 10%-át, étolaj termelésének pedig 12%-át teszik ki (Gupta & Pratap 2007).

María et al (2021) szerint ez a család 340 nemzetséget és 4636 fajt foglal magában. A *Brassica* fajok fenotipikusan hatalmas változatosságot mutatnak, köztermesztésbe azonban csak néhány került (Zandberg et al. 2022). A Mezőgazdasági termesztésbe vont fontosabb képviselői: a fejes káposzta, a kelkáposzta, a karfiol, a brokkoli, a bimbós kel, a karalábé, a kínai kel, az őszi káposztarepce, és az olajretek (Balázs et al. 2004).

A káposztafélék termesztése szempontjából a legjelentősebb országok Kína, India, Oroszország, Dél-Korea és Ukrajna (1. ábra). A globális termésmennyiség közel felét Kínában takarítják be ([http 1](#)).

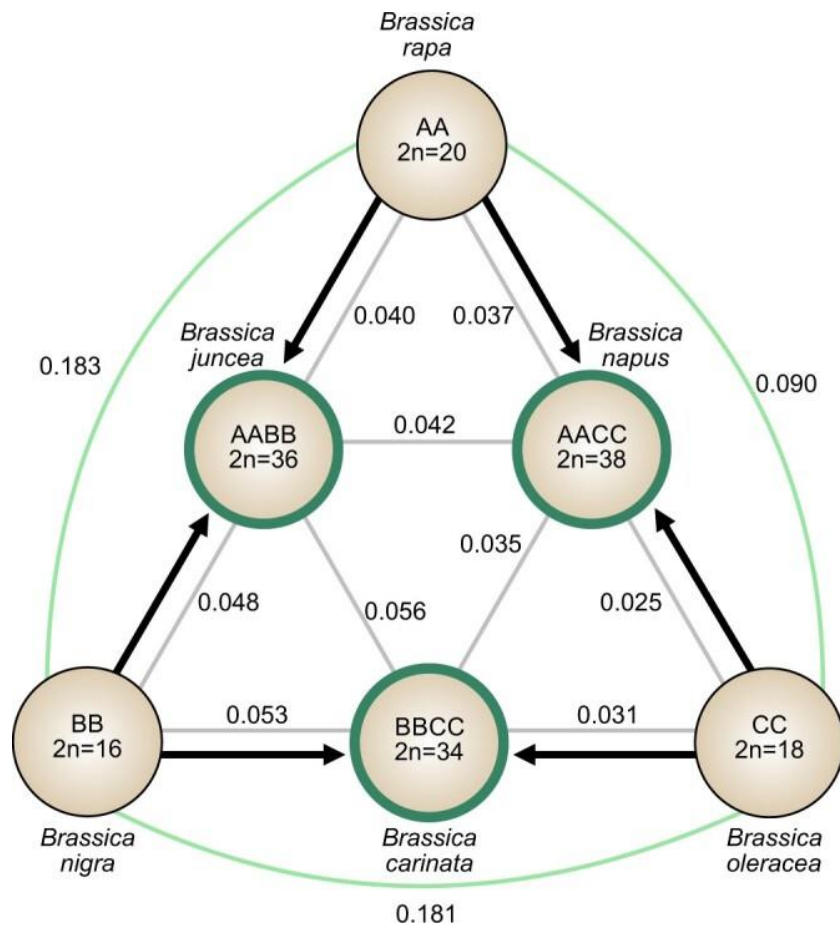
Az Európai Unióban, kifejezetten a káposzta termesztését tekintve az éves átlag 3,6–3,7 millió tonna. Lengyelország az első helyet foglalja el, ami évente átlagosan 0,8-1 millió tonnát jelent. Magyarországon a káposztafélék éves termésmennyisége 40-50 ezer tonnára tehető, ami átlagosan 4-5 ezer hektár termőterületről takarítanak be ([http 3](#)).



1. ábra: A káposztafélék globális termésmennyisége 1000 tonnában kifejezve 2020 Ázsia / Csendes-óceáni térség (http 2).

2.1.2 A káposztafélék genetikai sajátosságai

A genomösszetétel a növényvilágban rendkívül nagy változatosságot mutat, akár a rokonságban álló fajok kromoszóma száma is eltérhet egymástól (György et al. 2015). A növényi genomot vizsgáló számos kutatásnak köszönhetően, napjainkig a fajok 25%-a esetében már a kromoszómaszámot is meghatározták (Zoshuk et al. 2002). A káposztafélék családjának, a termesztés szempontjából 6 legnagyobb jelentőséggel bíró tagjáról, a ploiditát tekintve az alábbiakat lehet elmondani (2. ábra): a *Brassica rapa* (AA), *Brassica nigra* (BB) és *Brassica oleracea* (CC,) diploid, a *Brassica juncea* (AABB), *Brassica napus* (AACC) és a *Brassica carinata* (BBCC) pedig amfidiploid fajok (Gautam et al. 2014). A citogenetikai viszonyok meghatározásának alapjait Mantonnak (1932) köszönhetjük, aki elsőként határozta meg az egyes fajok kromoszómaszámát. Ezt követően Nagaharu (1935) az általa megalkotott U-háromszöggel szemléltette a *Brassica* fajok citogenetikai kutatására vonatkozó eredményeit (2. ábra).



2. ábra: A *Brassica* fajok genetikai kapcsolatát bemutató U-háromszög (Yim et al. 2022).

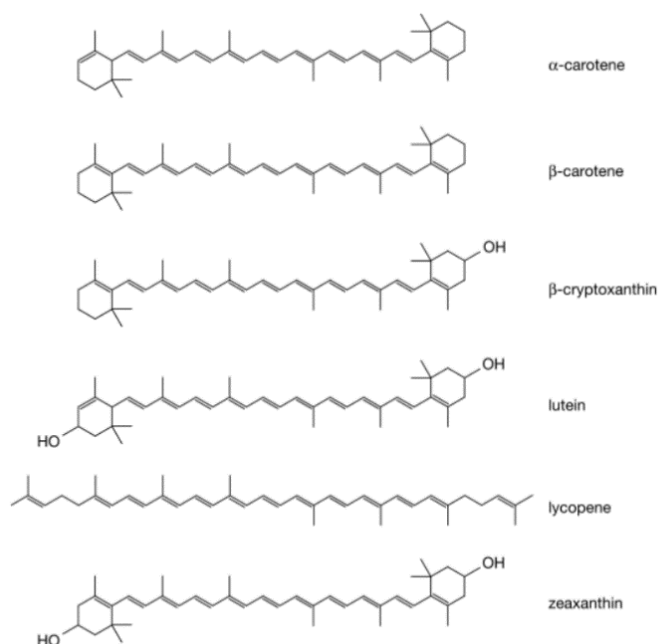
A 2. ábra a három diploid faj, a *B. rapa* 2n=20; a *B. nigra* 2n=6; a *B. oleraceae* 2n=18 és azok interspecifikus hibridizációja során létrejött három amfiploid fajt: *B. juncea* 2n=36; a *B. napus* 2n=38 és a *B. carinata* 2n=34 foglalja össze (Nagaharu, 1935). Az interspecifikus hibridizáció, azaz a spontán kereszteződések útján kialakult F1 hibridek teljes kromoszómakészlete megduplázódott, így létrehozva a 3 amfiploid fajt (Martin et al. 2007).

Az 1950-es évektől kezdődően a biotechnológia fejlődése számos területen, mint az embrió mentés, a protoplaszt fúzió vagy a molekuláris markerek már jóval részletesebb genom elemzést tett lehetővé. Valamint az azonosított, a szelekció során célzott tulajdonságokkal kapcsolt gének interspecifikus introgressziója is lehetővé vált a konvencionális nemesítés határian túl (Prakash et al. 2009). Napjainkban a legnagyobb ugrást a genomszekvenálás automatizálásának és kapacitásának fejlődése hozhatja el. A *Brassica* fajok szekvenálása érdekes eredményeket hozhat a növényi genom evolúciójára, valamint a növény-nemesítés szempontjából (Schmidt & Bancroft 2011).

2.2 A karotinodiok

2.2.1 A karotinodiok jellemzése

A karotinoidok emberi az táplálkozás szempontjából fontos forrása a leveles zöldségfélék. Napjainkig a legnagyobb figyelmet a β -karotin, a lutein, a zeaxantin, a likopin kapta (3.ábra) (Háda 2012).



3. ábra: A humán étrend szempontjából 6 legjelentősebb karotinoid szerkezeti képlete (Ellison 2016).

A növényvilág tagjainak, több mint 600 különböző karotinoid előállítása tulajdonítható (Schmidt et al. 2000). Kémiai szempontból izoprénvázas vegyületek. A karotin, azaz a sárgarépa pigmentje az egyik legrégebb óta ismert karotinoid (Molnár 2013). Fontos színező vegyületek. A halvány sárgától, a narancssárgán át, egészen a sötét vörösig (Misawa 2009).

Esszenciális szerepük van a fotoszintézisben (Von Lintig et al. 1997), és az olyan növényi hormonok előállításában, mint az abszizinsav vagy a strigolaktin (Hirschberg 2001), (Cazzonelli 2010). A kromoplasztisban pedig másodlagos anyagcsere termékeknek tekinthetők (Hirschberg 2001), (Hannoufa & Hossain 2012). Egyrészt a fotoszintetikus apparátus fénygyűjtő pigmentjei, másrészt védik a növényeket a

túlzott fényintenzitás során kialakuló oxidatív stressztől. Azzal, hogy lekötik az oxidatív stressz során kialakuló szabad gyököket (Conn et al. 1991).

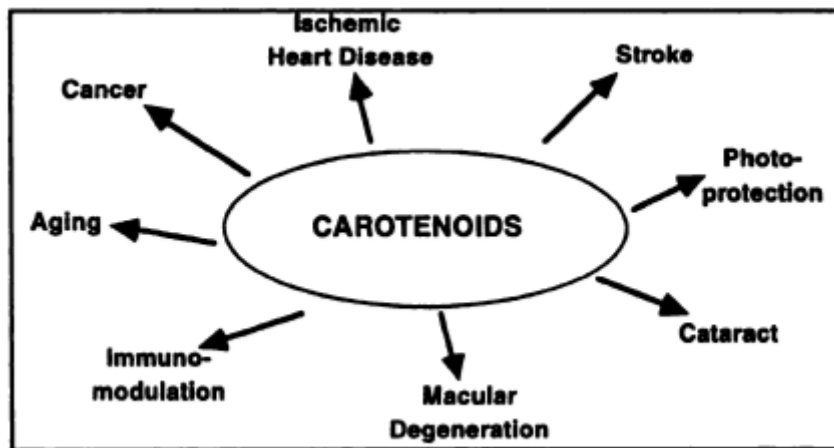
Nagy mértékben befolyásolják az íz és illatanyagokat, ezzel hozzájárulva a megporzó rovarok vonzásához (Hirschberg 2001), (Cazzonelli 2010).

2.2.2 Bioszintetikus út a karotinoidkhoz

A karotinoid bioszintézis lépései már 1970-es években ismertek voltak, azonban molekuláris szinten csak 1990 után kezdték el tanulmányozni a folyamatokat, azt követően, hogy a bioszintézisben résztvevő enzimek génjeit sikerrel klónozták (Hirschberg 2001). A bioszintézise többszörös foszforilezéssel, dekarboxilezéssel a mevalonsavból és izopentenil-pirofoszfátból (IPP) történik (Molnár 2013).

A legtöbb enzimet már molekuláris szinten is tanulmányozták, azonban a bioszintézis során fellépő cisz-transz izoméria egy kevésbé megértett terület. A karotin deszaturációja likopinné poli-cisz-izomer köztitermékeken keresztül megy végbe (Isaacson et al. 2004). A baktériumokban, egyetlen enzim, azaz a CrtI katalizálja a deszaturációt, amely során a szintelen fitoénből, a vörös likopén képződik. A növényekben mindez 2 deszaturáz, a fitoén-deszaturáz és a karotin-deszaturáz, valamint a CRTISO enzim segítségével megy végbe. A CRTISO lokuszt *Arabidopsis*-ban sikerrel azonosították, majd a klónozást követően *Escherichia coli*-ban expresszáltatták. Az enzimatis analízis megerősítette, hogy ez az enzim katalizálja a poli-cisz-karotinoidok izomerációját transz-karotinoiddá (Park et al. 2002).

A GGDP kódolja a kulcsenzimet (4. ábra). A PSY és a PDS kataláz termékei a karotinoid bioszintézis későbbi lépéseiben játszanak szerepet (Von Lintig et al. 1997). A karotinoid izomeráz azaz a CRTISO gén működése biztosítja (4. ábra) a poly-cisz likopin össz-transz-likopinné (β -karotin, likopin) alakítását (Isaacson et al. 2002).



5. ábra: A karotinoidok emberi egészségre gyakorolt jótékony hatásai – A daganatos, a szív- és érrendszeri betegségek, az agyvérzés, a szürkehályog, és az időskori makuladegeneráció megelőzése. Továbbá fényvédő pigmentek, kedvező hatással bírnak az öregedés és az emberi szervezet immun-aktivitása szempontjából (Mayne 1996).

2.3 A kínai kel (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) narancssárga mutációja

A kínai kel (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) Kínában széles körben termesztett zöldségféle. A belső levelek fehér, sárga és narancssárga színűek lehetnek (6. ábra) (Feng et al. 2012). Egyik legfontosabb agronómiai tulajdonsága is ez (Ruixing et al. 2023).

A narancssárga színhez vezető karotinoid felhalmozódás a belső levelekben egyetlen recesszív gén (*or*) által kontrollált (Zhang et al. 2013). Ez a narancssárga mutáció, a BrCRTISO karotinoid izomerázban található inszercióval magyarázható (Zhang et al. 2015).

A narancssárga fajták, kedvező tápanyag összetételüknek köszönhetően nagy népszerűségnek örvendenek (Shuacang et al. 2015). Wills és társai (1996) 7 különböző kínai kel fajtát vizsgáltak a karotinoid tartalomra nézve. Eredményeik szerint a legjelentősebb karotinoidok a lutein (36%) és a β -karotin (23%) voltak. A narancssárga kínai kel karotinoidja jóval nagyobb *in vivo* aktivitással bír, összehasonlítva a normál kínai kellel. Ilyen például az antioxidáns hatás. Az össz karotinoid mennyiség akár kétszeres is lehet a fehér kínai kelhez képest (Watanabe et al. 2011).



6. ábra: A fehér (WT) és narancssárga (Br-or) kínai kel belső levelei (Zhang et al. 2015).

Matsumo és társai (1998) RFLP markerekkel vizsgálták a belső leveleiben narancssárga színt hordozó kínai kelt. A térképezés során (oy-orange-yellow), azaz or gént az 1-es kapcsoltsági csoportban helyezték el. A további vizsgálatok pedig egyetlen lokusz által kontrolált recesszív génként azonosították.

Később Feng és társai (2012) egy 600 egyedet tartalmazó F2 térképezési populációból kiindulva terveztek or génnel szorosan kapcsolt markereket találni. Az or lokusz genetikai térképezését 5 SSR (simple sequence repeat) marker, valamint 2 morfológiai marker segítségével végezték el. A morfológiai markerek a narancssárga virág és szikleveél voltak. E két morfológiai marker a narancssárga belső levelekkel koszegregációt mutat. A térképezés során 4 szorosan kapcsolt kodomináns markert azonosítottak: ENA21, sau (N) 033, sau (C) 586, és syau19.

Lee és munkatársai (2014) pedig a génjelölt technikát alkalmazva 21, a karotinoid bioszintézisben résztvevő génre alapozva azonosította a kínai kel narancssárga mutációjáért felelős gént. Főképp a kettő karotinoid izomeráz génre a BrCRTISO1-re és a BrCRTISO2-re fókuszáltak. A BrCRTISO1 expressziója magasabb szintet mutatott, mint a BrCRTISO2 a hagyományos sárga színű fajtában. A BrCRTISO1 teljes transzkriptuma a narancssárga kínai kelben nem volt detektálható. A szekvencia analízis vizsgálatok bizonyították, hogy a narancssárga kínai kel BrCRTISO1 génje számos SNP-t, inszerciót és deléciót hordoz, összehasonlítva a hagyományos sárga

kínai kel BrCRTISO1 karotinoid izomerázával. Ezekre a polimorfikus régiókra alapozva, markert fejlesztettek a narancssárga fenotípus azonosításához.

Li és társai (2015) F2 térképezési populációt SSR markerekkel vizsgálva bror lokuszt a *B. rapa* A09 kromoszómán helyezték el. A génjelölt, azaz a BrCRTISO e lokuszban található. A kódoló és promóter régiókat homozigóta fehér és narancssárga genotípusokban szekvenálták. A narancssárga genotípus kódoló régiójában egy deléciót és 53 SNP-t azonosítottak. Továbbá a narancssárga genotípus promótere 141 bázispárral rövidebb volt, és számos SNP-t hordozott. Két Bror lokusszal F2 növényekben koszegregálódó markert terveztek. BrCRTISO transzkripciója magasabb szintet mutatott a fehér fenotípusú növényekben, mint a narancssárgákban. Ezek az eredmények a narancssárga kínai kel molekuláris nemesítésének alapjait fektették le.

Shuacang és társai (2015) ezt követően kínai kel BC1 populációt használt a narancssárga mutáció génjelölt finom térképezéshez. Három kapcsolt marker a Br-or lokuszt egy 9.47 kilobázisos régióra szűkítette, amely egyetlen funkcionális gént, a karotinoid izomerázt azaz BrCRTISO-t tartalmazta.

A molekuláris markerek hatékony eszközök a nemesítők kezében, amelyek segítségével követhetik a célzott tulajdonsággal kapcsolt genetikai lokuszt. Egy a Br-or lokusszal szorosan kapcsolt PCR alapú marker nagy lépést jelent a marker asszisztált szelekció szempontjából (Zhang et al. 2013).

2.4 A molekuláris markerek és a marker asszisztált szelekció

A molekuláris nemesítés a különböző biotechnológiák, kiváltképp a molekuláris markerek használatát jelenti a termesztett növények tulajdonságainak javítása céljából. Olyan nemesítési stratégiák létrejötte köszönhető a molekuláris nemesítésnek, mint a marker asszisztált szelekció, az introgressziós nemesítés, a rekurrens szelekció, a genom széleskörű asszociációs tanulmányozása vagy a predikciós nemesítés (Ribaut et al., 2010). A molekuláris markerek és a marker asszisztált szelekció nagyban segíti az agronómiai szempontból hasznos tulajdonságra való kiválasztás hatékonyságát (Staub et al. 1996).

A DNS markerek azon fragmentumai a DNS-nek, amelyek olyan mutációt hordoznak, melyet felhasználhatunk egy gén különböző alléljai közötti polimorfizmus kimutatásra. A polimorfizmus detektálására két módszert alkalmazhatunk, a

hibridizációt és a PCR technikát. A PCR vagy a hibridizációt követő elektroforézissel (agaróz, poliakrilamid) detektáljuk a szekvencia polimorfizmust, a keletkező termékek mérete és mobilitása alapján. Ezen túl olyan új technológiákat is alkalmaznak a detektálásra, mint az SNP chippel való hibridizálás (Guo-Liang 2013).

A marker alapú szelekció (MAS) előfeltétele, hogy a molekuláris marker szoros kapcsoltságban legyen a szelekció által célzott tulajdonsággal (Pepó 2010). A nemesítők a marker segített szelekció során olyan tulajdonságokra fókuszálnak, mint a biotikus és abiotikus stresszel szembeni ellenállóság, valamint az agronómiai szempontból mérvadó paraméterek. Az ezeket meghatározó mechanizmusok egyetlen domináns vagy recesszív gén, de akár QTL-ek által kerülnek kifejezésre. DNS markerekkel rezisztencia géneket (R gének) is azonosíthatunk, majd ezeket felhasználhatjuk az introgressziós nemesítés és a génpiramidálás során. Azonban sok rezisztenciát biztosító mechanizmus nem egyetlen gén, hanem számos gén által kontrolált mennyiségi tulajdonság. Ilyen mennyiségi tulajdonságok lehetnek az abiotikus stresszel szembeni toleranciát biztosító folyamatok (Ben-Ari 2012).

A marker asszisztált szelekció során használt DNS markereknek az alábbi kritériumoknak kell megfelelniük (Guo-Liang 2013):

- Magas szintű polimorfizmus
- Egyenlő eloszlás a genomban
- Kodominancia (Homo- és heterozigóta megkülönböztethetősége)
- Különböző allélek azonosíthatósága
- Nincs pleiotropikus hatás
- A gyakorlati alkalmazás alacsony költsége
- Könnyű detektálhatóság és automatizálás

A molekuláris növénynemesítés során használt leggyakoribb molekuláris marker technológiák az AFLP, az SSR, és az SNP (Guo-Liang 2013). A teljes genomi szekvencia ismerete esetén, már a bioinformatika segítségével is kereshetünk olyan géneket, amelyek megfelelően konzerváltak a genomban. A COS – Conserved Ortholog Set molekuláris marker technika szekvenciaspecifikus, alapjait a génekre tervezett primer párok biztosítják. Kizárólag olyan gének alkalmasok erre a feladatra, melyek egyetlen kópiában találhatók meg a genomban. Lehetővé teszi a fajok közötti összehasonlítást (Fulton et al. 2002). Az egykópiás génekre

fejlesztett markerek poliploid genomok vizsgálatára is alkalmasak. A szekvencia adatbázisok dinamikus fejlődésének köszönhetően a COS markerek mára már a *Brassica* fajokban is elérhetővé váltak (Jeong et al. 2014).

2.5 A polimeráz láncreakció

A polimeráz láncreakció a sejtekben természetes úton lezajló replikációt utánozza (Heszky et al. 2008). Lehetővé tette a DNS egy rövid, jól meghatározott szakaszának sokszorozását (Monostori & Csiba 2018). Ugrásszerű fejlődést hozott a biológia tudományában, ilyen például az emberi genom térképezése. Széles körben alkalmazott technológia klinikusok és kutatók által. Az egyik legrégebb alkalmazási területe a különböző kórokozók azonosítása. A reakciók szükséges templát DNS-t bármilyen szövetből izolálhatjuk (Garibyan & Avashia 2013).

A PCR technika felhasználási területei (Monostori & Csiba 2018):

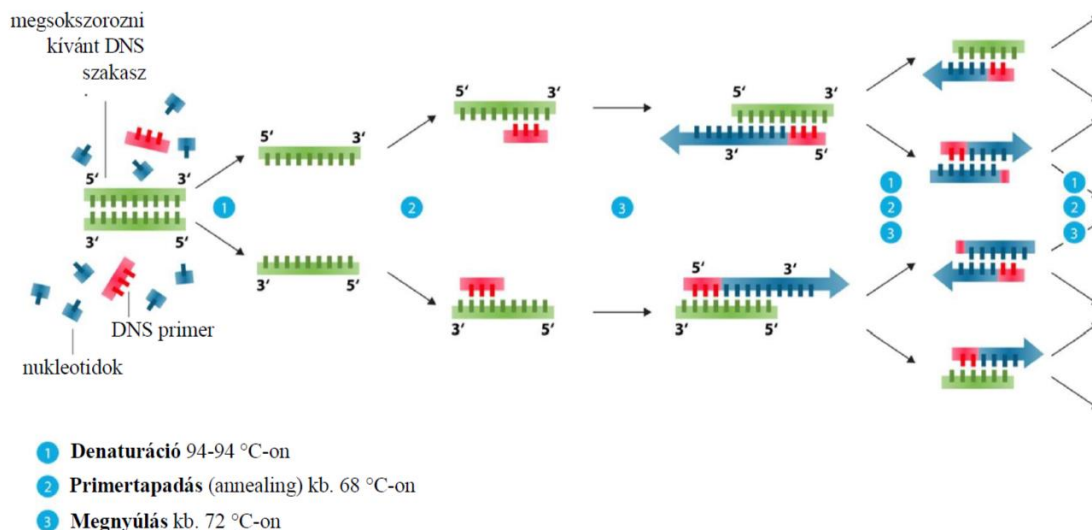
- Gének és DNS szakaszok klónozása, valamint felszaporítása
- DNS-szekvenciák azonosítása – Géntérképezés, markerezés
- Polimorfizmus kimutatása, DNS ujjlenyomat létrehozása

A PCR technika lépesei a következők (7. ábra) (Kiss 1999):

- A DNS denaturációja (90-94 °C)
- Az oligonukleotid primerek hibridizációja (36-72°C)
- 3' vég meghosszabbítás, dNTP adagolásával (72 °C)
- A ciklusok ismétlése (20-40)

A PCR reakció szükséges komponensei (Rajalakshmi 2017):

- PCR gép
- DNS izolátum
- Primerpár (Reverse és Forward)
- Taq-polimeráz
- Puffer
- dNTP
- Nukleotidok
- MgCl₂
- Desztillált víz



7. ábra: A polimeráz láncreakció (Monostori & Csiba 2018).

Az első ciklus során a sokszorozni kívánt DNS-szekvenciától eltérő hosszúságú fragmentumok jönnek létre, mivel ekkor még a teljes DNS szál rendelkezésre áll templátként. A második ciklustól kezdődően már a primerpárok által meghatározott fragmentumok szintetizálódnak, ezek mennyisége pedig 25-40 ciklus alatt exponenciálisan nő (7. ábra) (György et al. 2015). A sejtekben természetes úton lezajló replikáció során a DNS-polimeráz enzim működéséhez olyan RNS primerre van szükség, amely a templát DNS szállal hibridizál, azaz startjelként szolgál. A PCR reakcióban ilyenek a mesterségesen szintetizált oligonukleotid primerek (Heszky et al. 2008). A DNS-polimeráz a kulcsenzim a reakció során, amelyik összeköti a nukleotidokat. A primerek rövid meghatározott szekvenciájú DNS szakaszok, amelyek komplementerek a felszaporítandó DNS szakasszal (Garibyan & Avashia 2013).

A leggyakrabban alkalmazott PCR technikák: RT-PCR, Touchdown-PCR, Nested-PCR, Multiplex-PCR (Rajalakshmi 2017).

A Touchdown-PCR technika segítségével a primerek újratervezése nélkül optimalizálhatjuk a láncreakciót, specifikusabbá téve ezzel azt, valamint növelve a hozamot. A Touchdown-PCR reakció a tervezett primer tapadási hőmérsékletek (T_m) felett kezdődik, majd a ciklusok alatt fokozatosan alacsonyabb hőmérsékletekkel dolgozik. A nem specifikus fragmentumok szintetizálódása a PCR reakciók során sok bosszúságot okozhat. Az ilyen fragmentumok megjelenésének leggyakoribb oka a helytelenül megválasztott primer tapadási

hőmérsékletek. A Touchdown-PCR ellensúlyozhatja a primer tapadási hőmérsékletek tervezésének korlátait, nagy mértékben megkönnyítheti a reakciók optimalizálhatóságát, és csökkentheti a primerek újratervezésének szükségességét (Korbi & Mattick 2008).

A PCR reakció során nem specifikus fragmentumok is szintetizálódhatnak, amelyek lehetetlenné teszik a pontos kiértékelést. Ezen esetekben szükség van a PCR reakció körülményeinek optimalizálására. Ezt gyakran a reakció komponensek mennyiségének változtatásával, a tapadási hőmérsékletek újratervezésével, a ciklusok csökkentésével vagy Touchdown-PCR alkalmazásával közelítik meg. Ezek közül a tapadási hőmérsékletek megválasztása a reakciók legkritikusabb pontja, amely csak tapasztalati úton pontosítható. A PCR reakciók általában a primer tapadási hőmérsékletek alatt 5 °C-al kezdődnek. A nem specifikus fragmentumok megjelenése azt mutathatja, hogy az optimális primer tapadási hőmérsékletek a tervezettnél jóval magasabbak lehetnek. A Gradiens-PCR a legegyszerűbb technika arra, hogy empirikus úton megvizsgáljuk, és megválasszuk az optimális tapadási hőmérsékleteket (<http4>).

3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált növényanyag

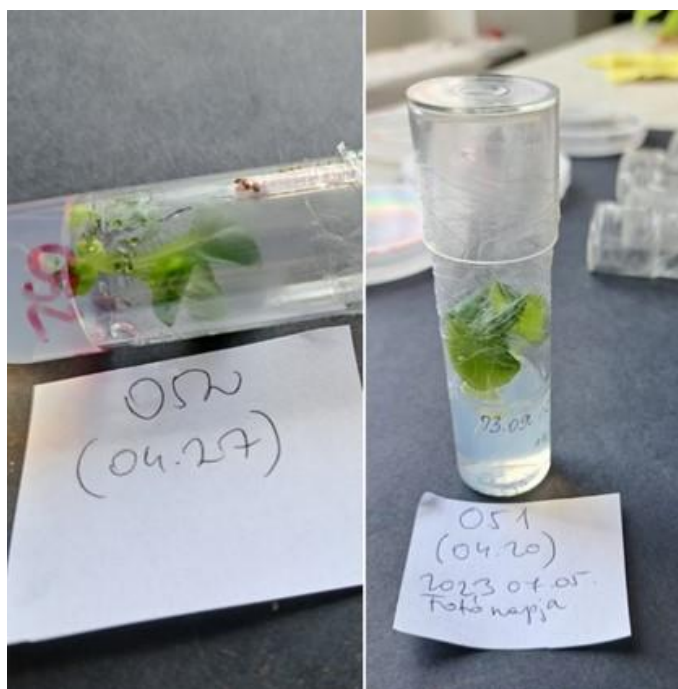
A kontrol növények (Karatálbé, Orankin, F1) és a nemesítési alapanyagok (O42, O44, Bridge_401, Bridge_404) mellett az 1. táblázatban felsorolt 6 genotípust elemeztük.

1. táblázat: A vizsgált genotípusok (8. és 9. ábra)

Genotípus neve	Keresztezés időpontja	Embriómentés	Csírázás	Színkód	Jelentőség
Karatálbé (<i>B. oleracea</i>)	-	-	-	-	Kontrol
Orankin (<i>B.rapa</i>)	-	-	-	-	Kontrol
F1 (Karatálbé x Orankin)	-	-	-	-	Kontrol
Bridge_401 (1. ábra)	-	-	-	-	Nemesítési alapanyag
Bridge_404	-	-	-	-	Nemesítési alapanyag
O42	2022.02.22.	-	-	-	Nemesítési alapanyag
O42	2022.03.27.	-	-	-	Nemesítési alapanyag
O44	2022.03.29.	-	-	-	Nemesítési alapanyag
O44	2022.04.12.	-	-	-	Nemesítési alapanyag
O51	2023.03.09.	2023.03.30.	2023.04.20.	Kék	Vizsgált genotípus

O51	2023.03.09.	2023.03.30.	2023.04.27.	Sárga	Vizsgált genotípus
O52	2023.03.23.	2023.04.27.	2023.05.27.	Zöld	Vizsgált genotípus
O52	2023.03.23.	2023.04.27.	2023.05.27.	Piros	Vizsgált genotípus
O52	2023.03.23.	2023.04.27.	2023.05.27.	Karmazsin	Vizsgált genotípus
O52	2023.03.30.	2023.04.27.	2023.05.27.	Pink	Vizsgált genotípus

A keresztezésekbe vont Bridge401 és Bridge404 növények pontos eredetét nem ismerjük. A genomösszetétel szempontjából átmenetet képeznek *B. rapa* és *B. oleracea* között.



8. ábra: O51 és O52 embriómentett növények.



9. ábra: A Bridge401, az O52 Karmazsin, az O52 Pink és az O51 növények.

3.2 A DNS izolálás

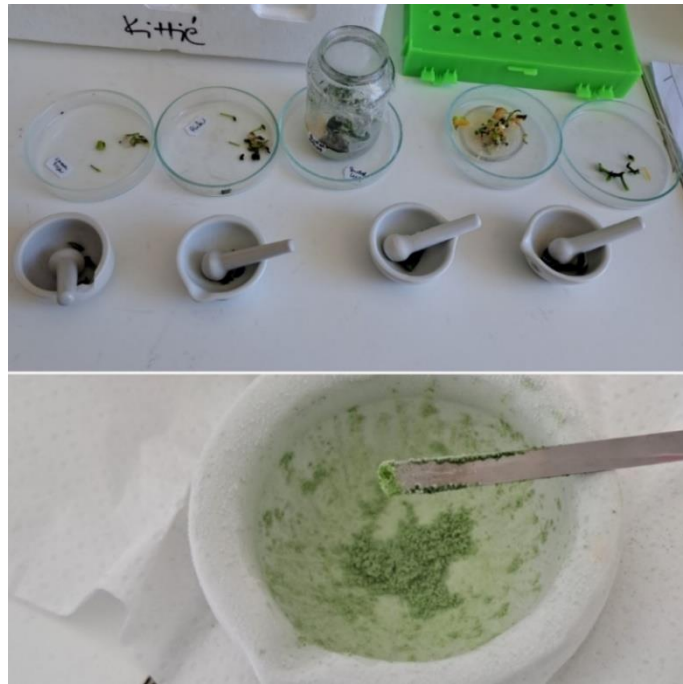
A Syngenta Magyarország Kft ócsai telephelyén üvegházban, valamint a Genetika és Genomika Tanszéken embriómentett, in vitro körülmények között nevelt növényekről leveleket szedtünk (1. táblázat). Szükség esetén a leveleket a DNS izolálásig -70 °C-on tároltuk.

A DNS kivonást a növények leveléből Macherey Nagel® NucleoSpin DNS kit segítségével végeztük a gyártó által megadott protokoll, valamint a Genetika és Genomika Tanszék tapasztalatai alapján.

A protokoll lépései:

1. 0.1 g minta homogenizálása mozsárban folyékony nitrogén segítségével (10. ábra)
2. A homogenizált minta eppendorf csőbe helyezése
 - 400 µl PL1 puffer hozzáadása
 - Vortex
 - 10 µl RNáz hozzáadása
 - Vortex

- Inkubálás: 65 °C, 10 min
 - Vortex
 - Centrifuga: 5 min, 11.000 x g (Tanszéki tapasztalat alapján)
 - Minta áttöltése 2 ml-es eppendorf csőbe helyezett lila NucleoSpin® oszlopba (szűrő)
 - Centrifuga: 2 min, 11.000 x g
 - Lila oszlop eldobása
3. 400 µl PC puffer hozzáadása
- Vortex: 30 sec
4. Zöld NucleoSpin® oszlop (szilika gél membrán) új 2 ml-es eppendorf csőbe helyezése
- 600 µl minta oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
5. Szilika-membrán mosása és szárítása
- 400 µl PW1 puffer Oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
 - 600 µl PW2 puffer oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
 - 300 µl PW2 puffer oszlopba pipettázása
 - Centrifuga: 2 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta kidobása, oszlop megtartása
 - Centrifuga üresen: 2 min, 11.000 x g (Tanszéki tapasztalat alapján)
6. Oszlop új 1.5 ml-es eppendorf csőbe helyezése
- 50 µl PE puffer oszlopba pipettázása
 - Inkubálás: 65 °C, 5 min
 - Centrifuga: 1 min, 11.000 x g
 - Átfolyt minta megtartása
 - 7-es pont lépéseinek megismétlése a PE puffer pipettázásától



10. ábra: Levelek morzsolása folyékony nitrogén segítségével

A DNS minta tisztaságát és koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel ellenőriztük (11. ábra). Szükség esetén hígítást végeztünk.



11. ábra: NanoDrop ND-1000 spektrofotométer

3.3 A PCR körülmények és reakciók

3.3.1 A primerpárok

Annak megállapítására, hogy a vizsgált növényanyagok hordozzák-e a számunkra fontos kínai kel narancssárga színéért felelős mutáns CRTISO1 gént a Bra-OR és BolCRTISO1 primer párok voltak segítségünkre. A növények genom összetételét pedig a COS markerekkel vizsgálhatjuk (2. táblázat).

2. táblázat: Bra-OR és BolCRTISO1 primerpárok szekvenciái és tapadási hőmérsékletei (Szűcs 2015), valamint a COS015, COS264, COS420, COS424 primerpárok szekvenciái és tapadási hőmérsékletei (Jeong et al. 2014).

Primer pár	Szekvencia	Tapadási hőmérséklet (°C)
Bra-OR-Forward	5'-GAGGTCTGTTTCTACGAGTACGG -3'	62.9
Bra-OR-Reverz	5'- CTCATTAGTCCATCTCCGACCA -3'	65.1
BolCRTISO1-Forward	5'-GGATATGCCCATCTTATTTGACC -3'	64.1
BolCRTISO1-Reverz	5'- GCTCTCATGCAACGGAACAA -3'	66.3
COS015-Forward	5'- ATCAATGCGGTTGTGATGAT -3'	52.5
COS015-Reverz	5'- GTTCGCTGTCTTGACCTTTTTGAT -3'	56
COS264-Forward	5'- GCGAAAGTCTCCGTCGAG -3'	55.6
COS264-Reverz	5'- TCCGTCTCTTCTTTGAGTCTCTTT -3'	55.5
COS420-Forward	5'- GCGCGAACTACTCGCTAAAC -3'	56.3
COS420-Reverz	5'- GATCTCATCTTCTGTGAAGTCCAA -3'	54.4

COS424- Forward	5'- CACATGCAGAAAATTCTTTCAAAC - 3'	51.8
COS424- Reverz	5'- TGAATCATCGTATTTGAGAGTTGTG -3'	53.3

3.3.2 A Gradines- és Touchdown-PCR reakciók

A COS (Conserved Ortholog Set) primerek optimális tapadási hőmérsékletét Gradiens PCR reakciók segítségével állapítottuk meg. A reakciók során DreamTaq (Thermo Scientific™) Taq polimeráz enzimet használtunk, a minták végtérfogata pedig 10 µl (2 µl DNS + 8 µl mastermix) volt (3. táblázat). Első megközelítésben a Gradiens PCR reakciók minimum és maximum primer tapadási hőmérsékleteit a COS primerpárok kalkulált alacsonyabb tapadási hőmérséklete alatt 0.5°C-al, valamint a magasabb tapadási hőmérséklet felett 0.5°C-al határoztuk meg.

3. táblázat: A PCR mastermix

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

4. táblázat: A Gradiens-PCR reakciók primer tapadási hőmérséklet intervallumai és növényanyaga

PCR reakció száma	Primer	Tapadási hőmérséklet (°C)	Gradiens PCR intervalluma (°C)	Vizsgált gDNS
PCR1	COS015-Forward	52.5	52-56.5	Karlábé, Orankin, F1
PCR1	COS015-Reverz	56		
PCR1	COS264-Forward	55.6	55-56.1	Orankin, F1
PCR1	COS264-Reverz	55.5		
PCR1	COS420-Forward	56.3	53.9-56.8	Karlábé, Orankin
PCR1	COS420-Reverz	54.4		
PCR1	COS424-Forward	51.8	51.3-53.8	F1, Karlábé
PCR1	COS424-Reverz	53.3		
PCR2	COS015-Forward	52.5	55.9-65	Orankin
PCR2	COS015-Reverz	56		
PCR2	COS264-Forward	55.6		
PCR2	COS264-Reverz	55.5		
PCR2	COS420-Forward	56.3		
PCR2	COS420-Reverz	54.4		

Az Gradiens-PCR reakciók lépései (12. ábra):

COS015 primerpárral BIOER™ Gene Explorer PCR gépben (13. ábra):

1. Inicializáció: 94 °C; 3 min
2. Denaturáció: 94 °C; 30 sec
3. Kapcsolódás: 52-56.5 °C; 30 sec
4. Meghosszabbítás: 72 °C; 1 min
5. 2-4. lépések ismétlése: 34 ciklus
6. Keverék állandó hőmérsékleten tartása: 4 °C

COS264 primerpárral BIORAD™ iCycler PCR gépben (13. ábra):

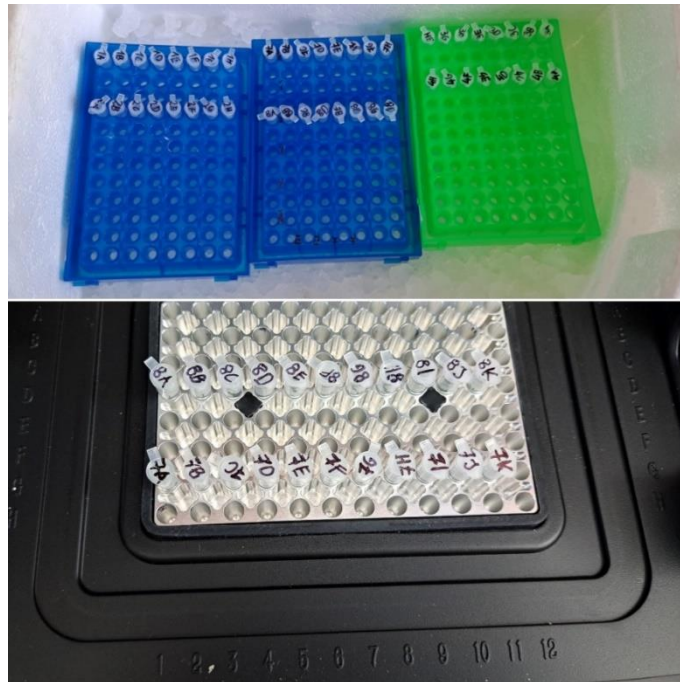
1. Inicializáció: 95 °C; 30 sec
2. Denaturáció: 95 °C; 30 sec
3. Kapcsolódás: 55-56.1 °C; 30 sec
4. Meghosszabbítás: 72 °C; 1 min
5. 2-4. lépések ismétlése: 30 ciklus
6. Keverék állandó hőmérsékleten tartása: 4 °C

COS420 primerpárral BIORAD™ T100 PCR gépben (14. ábra):

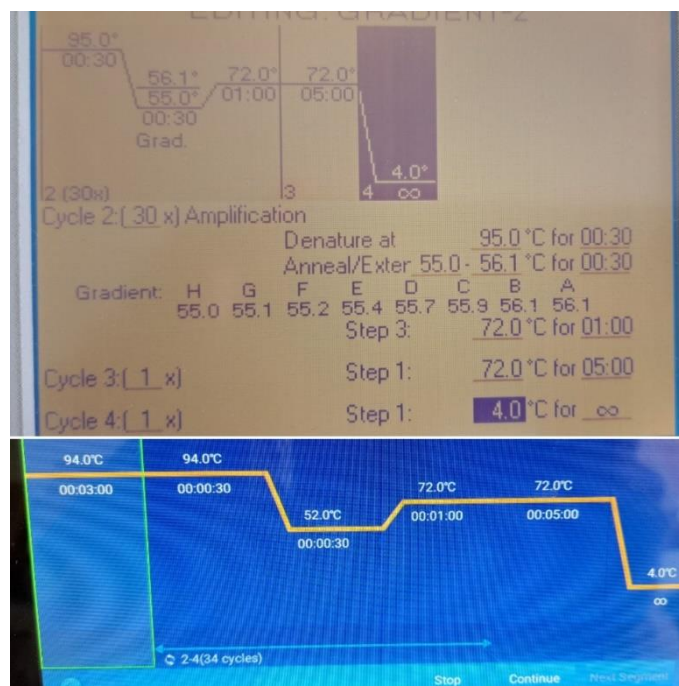
1. Inicializáció: 95 °C; 3 min
2. Denaturáció: 95 °C; 30 sec
3. Kapcsolódás: 53.9-56.8 °C; 30 sec
4. Meghosszabbítás: 72 °C; 1 min
5. 2-4. lépések ismétlése: 34 ciklus
6. Keverék állandó hőmérsékleten tartása: 4 °C

COS424 primerpárral BIORAD™ T100 PCR gépben (14. ábra):

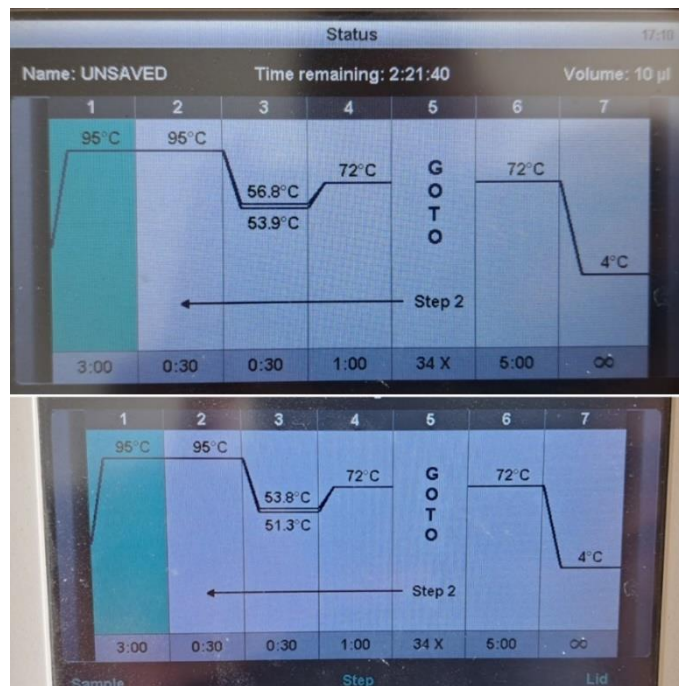
1. Inicializáció: 95 °C; 3 min
2. Denaturáció: 95 °C; 30 sec
3. Kapcsolódás: 51.3-53.8 °C; 30 sec
4. Meghosszabbítás: 72 °C; 1 min
5. 2-4. lépések ismétlése: 34 ciklus
6. Keverék állandó hőmérsékleten tartása: 4 °C



12. ábra: Gradiens-PCR reakciók előkészítése



13. ábra: COS015 és COS264 Gradiens-PCR



14. ábra: COS420 és COS424 Gradiens-PCR

A mutáns CRTISO1 gén jelenléte-, valamint a COS marker alapú genom összetétel vizsgálatokban a Gradiens-PCR reakciók alapján meghatározott optimális tapadási hőmérsékleteket használtuk a Touchdown-PCR-ekben a 24 ciklus alatti annealing során. A DNS polimeráz enzim és a PCR mastermix összetevői megegyeznek a Gradiens-PCR reakciók alatt alkalmazottakkal (3. táblázat). A vizsgálatokat két ismétlésben végeztük el.

A Bra-OR, COS015, COS264, COS420 primerekkel egy BioRad™ T100 PCR gépben dolgoztunk, 70 °C-os Touchdown PCR-t alkalmazva az alábbiak szerint:

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

4. Utópolimerizáció: 72 °C, 5 perc.

A BolCRTISO1 és a COS424 primerekkel is egy BioRad™ T100 PCR gépben dolgoztunk, 65 °C-os Touchdown PCR-t alkalmazva az alábbiak szerint:

1. előciklus: 94 °C, 2 perc ('hot start')

2. 10 cikluson keresztül a következő lépések, amely során az annealing hőmérséklete ciklusonként 0.5 °C-kal csökken:

- Denaturálás: 94 °C, 30 másodperc,

- Annealing: 65 °C, 30 másodperc,

- Szintézis: 72 °C, 1 perc,

3. 24 cikluson keresztül a következő lépések:

- Denaturálás: 94 °C, 30 másodperc,

- Annealing: 65 °C, 30 másodperc,

- Szintézis: 72 °C, 1 perc,

4. Utópolimerizáció: 72 °C, 5 perc.

3.4 Agaróz gélelektroforézis

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

Az agaróz gél öntés lépései:

1. Összetevők kimérése: 120 ml 0,5 x TBE puffer, 1,2 g agaróz,

2. A pufferhez hozzáadjuk az agarózt, majd mikrohullámú sütőben a homogén állapot eléréséig melegítjük

3. Folyóvíz alatt visszahűtjük folyamatos mozgatás mellett,

4. 6 µl etídium-bromid hozzáadása a folyékony gélhez, majd keverés

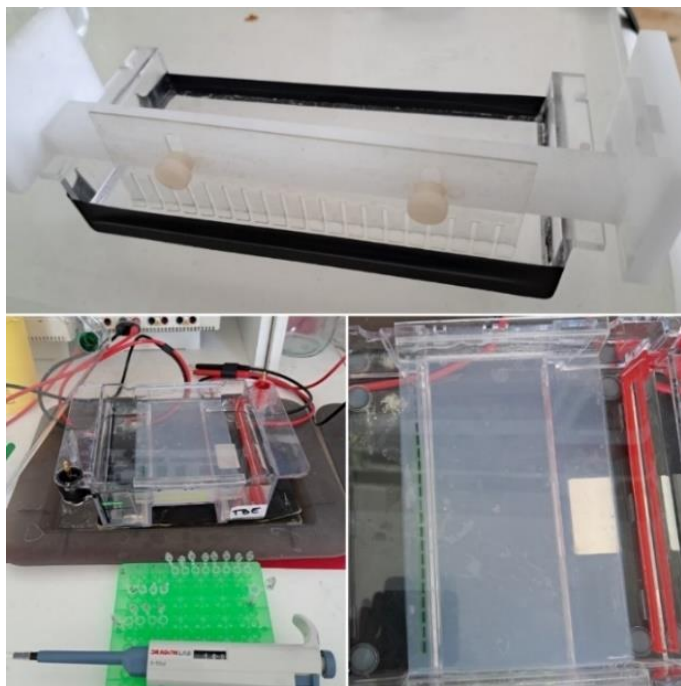
5. az előkészített, tiszta tálcába öntjük a gél, a keletkező buborékokat pipetta hegygel eltávolítjuk

A zsebek kialakításához a fésűt a gél szélével párhuzamosan, kb. 1 cm távolságra igazítottuk a még folyékony gélbe (15. ábra). A már kihűlt és megszilárdult gél futtatókádba helyeztük el.

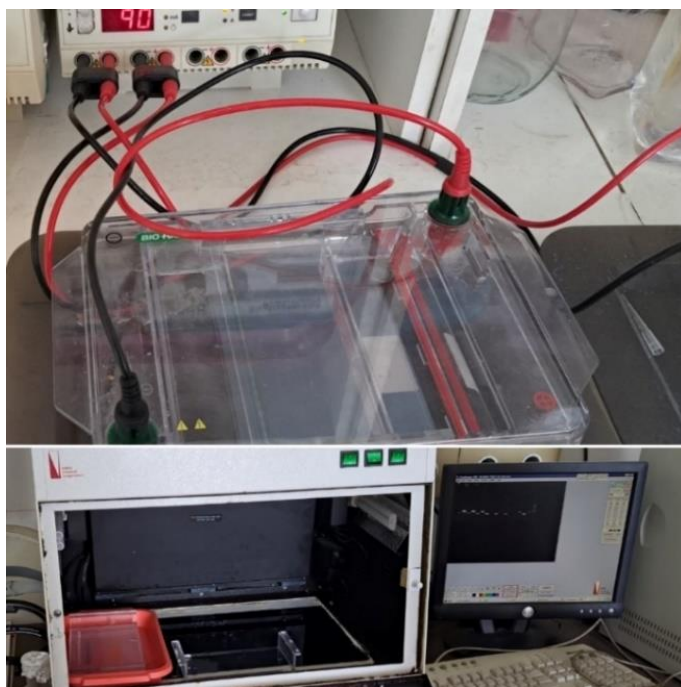
Molekulatömeg markerként GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder (Thermo Fisher) szolgált.

Az elektroforetikus eljárás 90 V-on 40 percig tartott a 0,5x TBE pufferben a BIO RAD™ Power Pac 300 elektroforézis tápegység használatával (16. ábra).

A futtatást követően a detektált fragmentumok kiértékelésére az Alpha Innotech Multimage™ Light Cabinet gédokumentációs készülékkel történt (16. ábra), amely egy elzárt fülkében UV megvilágítással gerjeszti a fragmentumokban interkalálódott festéket, valamint fénykép is készíthető a gélről.



15. ábra: A fészű elhelyezése és a minták pipettázása



16. ábra: A futtatás és a géldokumentáció

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEŚÜK

4.1. Az izolált DNS koncentrációk

A Macherey Nagel® NucleoSpin DNS kit segítségével végzett genomi DNS izolálás NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mért koncentrációi (5. táblázat):

5. táblázat: gDNS koncentrációk

Növény	gDNS Koncentráció (µg / OD260)
Karalábé	57.4
O42(02.22)	49.3
F1	46.5
Bridge_401	44.6
Bridge_404	38.4
Orankin	37.9
O42(03.27)	36.4
O44(04.12)	36.4
044(03.29)	36.3
O52 Zöld	18.4
O51 Kék	14
O51 Sárga	13.9
O52 Karmazsin	13.2
O52 Pink	12.5
O52 Piros	11.1

Az O51 kék, az O51 sárga, az O52 zöld, az O52 piros, az O52 karmazsin és O52 pink embriómentett növények esetében ugyan a PCR-technikára kifejezetten alkalmas preparátumokat kaptunk, azonban alacsonyabb koncentrációkkal. Mindez feltehetőleg annak köszönhető, hogy kevésbé fejlett *in vitro* növényekből (9. ábra), kisebb tömegű növényanyagból végeztük a DNS izolálást.

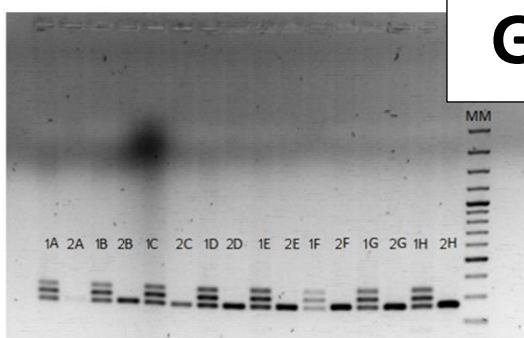
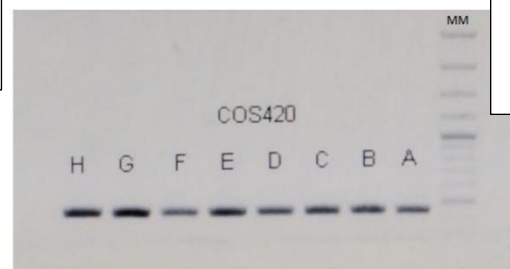
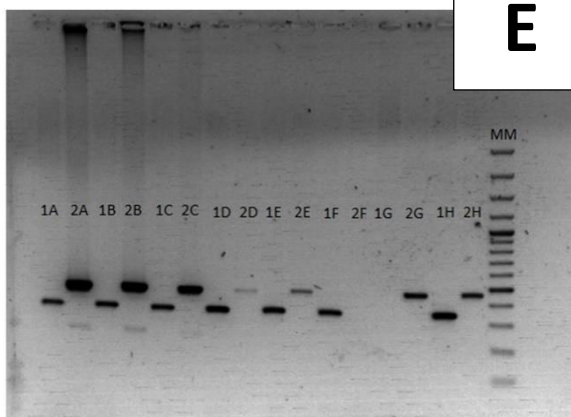
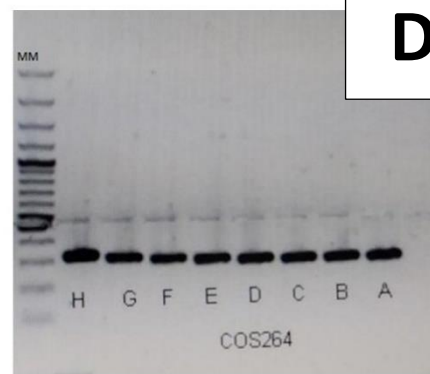
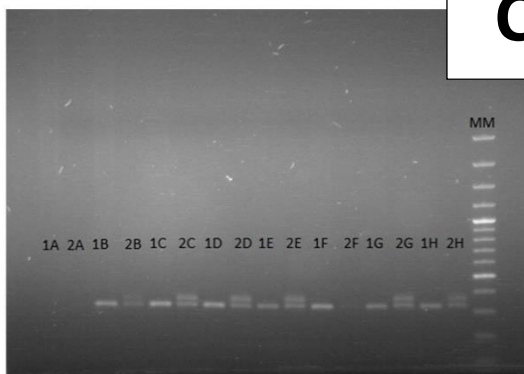
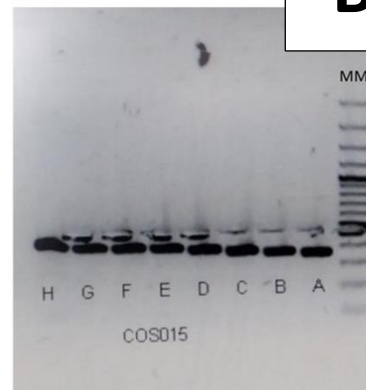
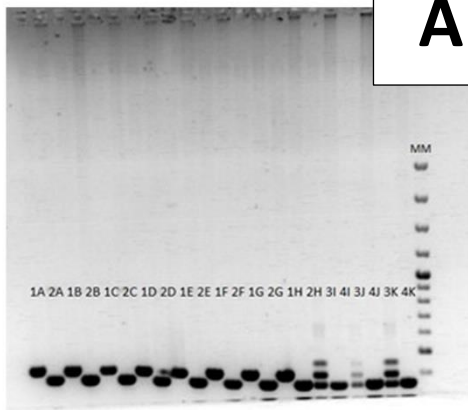
4.2 A Gradiens-PCR reakciók eredményei

A COS015 primerpárral folytatott első Gradiens-PCR reakció során (17. ábra (A)): Minden hőmérsékleten, és minden minta esetében detektálható fragmentum. Az Orankin (*B. rapa* – AA), és Karalábé (*B. oleracea* – CC) mintáknál az elvárásoknak megfelelően eltérő méretű fragmentumokat kaptunk. Az F1 (AC) növénynél azonban 3 fragmentum látható. A primerpár a legmagasabb hőmérsékleten is képes volt amplifikálni, ezért a második megközelítésben magasabb primer tapadási hőmérsékletekkel indítottunk Gradients PCR-t. Melyet követően (17. ábra (B)): Minden hőmérsékleten detektálható fragmentum, a legtisztább képet azonban, a legmagasabb hőmérsékleten, azaz 65 °C -on kapjuk.

A COS264 első Gradiens-PCR eredményeit tekintve (17. ábra (C)): Feltehetőleg az 1A, 2A és 2F zsebekbe nem került templát. Az F1 (AC) növényeknél a várakozásain szerint 2 fragmentum látható. A pontosabb detektálhatóság céljából célszerű a primer tapadási hőmérsékletek emelése. Második megközelítésben (17. ábra (D)): Minden hőmérsékleten detektáltunk fragmentumot.

A COS420 első Gradiens-PCR reakciójának összeállítása során (17. ábra (E)): Feltehetőleg az 2F és 1G zsebekbe nem került templát. Az Orankin (*B. rapa* – A), és Karalábé (*B. oleracea* – C) mintáknál eltérő méretű fragmentumokat kaptunk. A primerpár a legmagasabb hőmérsékleten is képes volt amplifikálni, ezért másodszorra magasabb primer tapadási hőmérsékletekkel indítottunk Gradients-PCR-t. Így (17. ábra (F)): Minden hőmérsékleten detektálható fragmentum.

A COS424 Gradiens-PCR eredményei alapján az alábbiakat mondhatjuk (17. ábra (G)): Érdekes módon az alacsonyabb hőmérsékleten intenzívebb fragmentumokat kaptunk, ugyanakkor az F1 (AC) mintáknál 3 fragmentum is látható, ezért a primer tapadási hőmérsékletek emelése szükséges a PCR reakciók során.

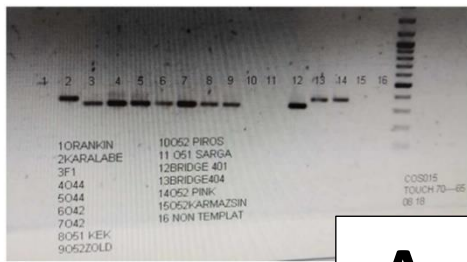


17. ábra: 1%-os agarózgél EtBr-al festve, MM: GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder; **(A) COS015 primerpár Gradiens-PCR 1**, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 Orankin;; **(B) COS015 primerpár Gradiens-PCR 2**, minta: Orankin; **(C) COS264 primerpár Gradiens-PCR 1**, mintasorrend:1 Orankin, 2 F1; **(D) COS264 primerpár Gradiens-PCR 2**, minta: Orankin; **(E) COS420 primerpár Gradiens-PCR 1**, mintasorrend:1 Karalábé, 2 Orankin; **(F) , COS420 primerpár Gradiens-PCR 2**, minta: Orankin; **(G) COS424 primerpár Gradiens-PCR**, mintasorrend:1 F1, 2 Karalábé.

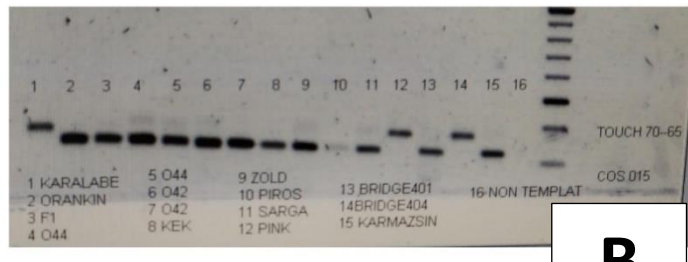
4.3 A COS primerpárok Touchdown-PCR eredményei

A gradiens-PCR eredmények alapján meghatározott Touchdown 70–65°C protokollt a COS015, a COS264 és a COS420 primerpárokkal két ismétlésben végeztük el.

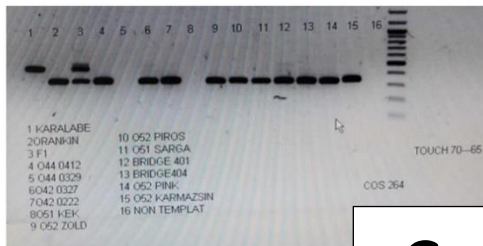
A COS015 primerpárral folytatott első PCR reakciót követően (18. ábra (A), 6. táblázat) a várakozások szerint non templát mintánál nem jelent meg fragmentum. Az Orankin (*B. rapa* – AA), Karalábé (*B. oleracea* – CC) és F1 (AC) kontrol mintáknál korán sem az elvárt eredményeket kaptuk. Ugyan a Karalábénál a várt hosszúságú fragmentum szintetizálódott, azonban az Orankin esetében nem jelent meg fragmentum, feltehetőleg ebbe a zsebbe nem került templát, az F1 kontroll mintánál pedig csak A genom specifikus fragmentum látható. Az O42, valamint O44 keresztezésekből származó, a Bridge401, illetve a O51 Kék és az O52 Zöld színekű növényeknél csak AA genom specifikus fragmentumok jelentek meg. Az O52 Piros, az O51 Sárga és az O52 Karmazsin mintáknál nem kaptunk fragmentumot, feltehetőleg a PCR reakció, vagy a gélre történő felvitel hibájából. A Bridge404, valamint a O52 Pink színekű növényeknél pedig csak C genomra jellemző fragmentumok detektálhatók.



A



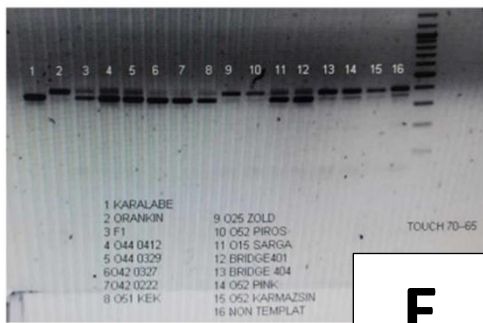
B



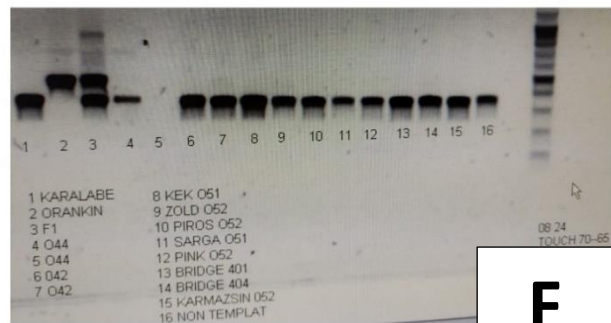
C



D



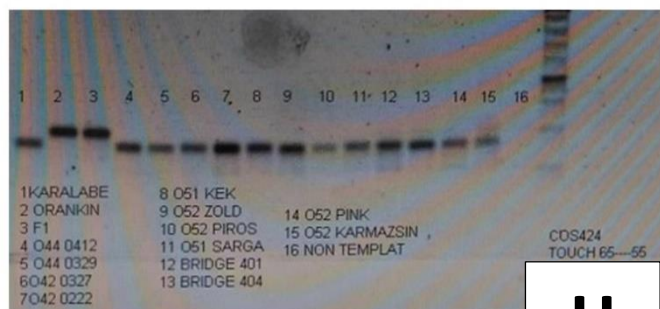
E



F



G



H

18. ábra: 1%-os agarózgél EtBr-al festve, MM: GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder; **(A) COS015 primerpár Touchdown-PCR 1**, 70 - 65 °C, mintasorrend: 1 Orankin, 2 Karalábé, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink, 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(B) COS015 primerpár Touchdown-PCR 2**, 70 – 65 °C , mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 O52 Pink, 13 Bridge401, 14 Bridge404, 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(C) COS264 primerpár Touchdown-PCR 1**, 70 - 65°C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(D) COS264 primerpár Touchdown-PCR 2**, 70 - 65 °C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 O52 Pink 13 Bridge401, 14 Bridge404 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(E) COS420 primerpár Touchdown-PCR 1**, 70 - 65°C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(F) COS420 primerpár Touchdown-PCR 2**, 70 - 65 °C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 O52 Pink 13 Bridge401, 14 Bridge404 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(G) COS424 primerpár Touchdown-PCR 1**, 65 – 55 °C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(H) COS424 primerpár Touchdown-PCR 2**, 65 – 55 °C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát.

A COS primerpárokkal folytatott Touchdown-PCR reakciók eredményeit a 6. táblázat foglalja össze. Adott genom specifikus fragmentum jelenlétét a gélen „+” jellel, hiányát pedig „-” jellel rögzítettük. Az „na.” tartalmazó cellák esetében nem működött a PCR reakció.

6. táblázat: A COS primerpárok Touchdown-PCR eredményei

		Primerpár							
		COS015		COS264		COS420		COS424	
PCR reakció	Növény	A genom	C genom	A genom	C genom	A genom	C genom	A genom	C genom
1	Non templát	-	-	-	-	+	+	+	+
1	Karalábé	-	+	-	+	-	+	-	+
1	Orankin	na.	na.	+	-	+	-	+	-
1	F1	+	-	+	+	+	+	+	-
1	Bridge_401	+	-	+	-	+	+	+	+
1	Bridge_404	-	+	+	-			+	+
1	O42(02.22)	+	-	+	-	+	+	-	+
1	O42(03.27)	+	-	+	-	+	+	-	+
1	O44(03.29)	+	-	+	-	+	+	-	+
1	O44(04.12)	+	-	na.	na.	+	+	+	+
1	O51 Kék	+	-	na.	na.	+	+	-	+
1	O51 Sárga	na.	na.	+	-	+	+	+	+
1	O52 Karmazsin	na.	na.	+	-	-	+	+	+
1	O52 Pink	-	+	+	-	-	+	+	+
1	O52 Piros	na.	na.	+	-	-	+	+	+
1	O52 Zöld	+	-	+	-	-	+	+	+
2	Non templát	-	-	-	-	-	+	-	-

2	Karalábé	-	+	-	+	-	+	-	+
2	Orankin	+	-	+	-	+	-	+	-
2	F1	+	-	+	-	+	+	+	-
2	Bridge_40 1	+	-	+	-	-	+	-	+
2	Bridge_40 4	-	+	-	+	-	+	-	+
2	O42(02.22)	+	-	+	-	-	+	-	+
2	O42(03.27)	+	-	+	-	-	+	-	+
2	O44(03.29)	+	-	+	-	-	+	-	+
2	O44(04.12)	+	-	+	-	na.	na.	-	+
2	O51 Kék	+	-	+	-	-	+	-	+
2	O51 Sárga	+	-	na.	na.	-	+	-	+
2	O52 Karmazsin	+	-	-	+	-	+	-	+
2	O52 Pink	-	+	-	+	-	+	-	+
2	O52 Piros	na.	na.	na.	na.	-	+	-	+
2	O52 Zöld	+	-	-	+	-	+	-	+

A COS015 primerpárral folytatott második PCR reakciót követően (18. ábra (B), 6. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum.
- Az Orankin (B. rapa – AA), Karalábé (B. oleracea – CC) kontroll mintáknál eltérő méretű fragmentumokat amplifikált a primer pár.

Az F1 (AC) kontroll mintánál viszont ismét csak A genomra specifikus fragmentumot kaptunk. Az első ismétléshez hasonlóan Az O42, valamint O44 keresztezésekből származó, a Bridge401, illetve az O51 Kék, az O52 Zöld, az O52 Piros,

az O51 Sárga és az O52 Karmazsin színekű növényeknél csak A genom specifikus fragmentumok láthatók. A 10-es, azaz O51 Sárga színekű minta esetében a halvány fragmentum a PCR reakció vagy a futtatás hibájából fakadhat. Ahogy az első ismétlés során is a Bridge404, valamint az O52 Pink színekű növényeknél csak C genomra jellemző fragmentumok jelentek meg.

A COS264 primerpárral folytatott első PCR reakciót követően (18. ábra (C), 6. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum.
- Az Orankin (B. rapa – A), Karalábé (B. oleracea – C) kontroll mintáknál eltérő méretű fragmentumokat amplifikált a primer pár.
- Az F1 (AC) kontroll mintánál pedig A és C genomra jellemző fragmentumokat is megkaptuk.

Az O42, valamint O44 keresztezésekből származó, az O52 Zöld, az O52 Piros, az O51 Sárga, az O52 Pink és az O52 Karmazsin színekű növények esetében csak A genomra jellemző fragmentumok detektálhatók. Az 5-ös, azaz az egyik O44-es keresztezésből származó, illetve a 8-as vagy is az O51 Kék színekű növények esetében nem amplifikálódott fragmentum.

A COS264 primerpárral folytatott második PCR reakciót követően (18. ábra (D), 6. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum.
- Az Orankin (B. rapa – A), Karalábé (B. oleracea – C) kontroll mintáknál eltérő méretű fragmentumokat amplifikált a primer pár.
- Az F1 (AC) kontroll mintánál pedig csak A genomra jellemző fragmentumot kaptuk.

Az O42, valamint O44 keresztezésekből származó, az O51 Kék színekű és a Bridge401 növényeknél csak A genom fragmentumai szintetizálódtak. A Bridge404, az O52 Zöld, az O52 Pink és az O52 Karmazsin színekű növények esetében csak C genom fragmentumai láthatók. Az O52 Piros és az O51 Sárga színekű minták esetében nem detektálható fragmentum. Mindkét ismétlés esetében az O52 Pink színekű és a Bridge404 növények eredményei megegyeznek a COS015 primerpárral futtatott PCR

reakciók során tapasztaltakkal. Jelen reakciónál futtatás tökéletlensége a létrán is tapasztalható, a pontos következtetések levonásához szükséges a futtatás megismétlése.

A COS420 primerpárral folytatott első PCR reakciót követően (18. ábra (E), 6. táblázat):

- Sajnos a non templátnál is kaptunk fragmentumot
- Az Orankin (B. rapa – A), Karalábé (B. oleracea – C) kontroll mintáknál eltérő méretű fragmentumokat amplifikált a primer pár.
- Az F1 (AC) kontroll mintánál pedig A és C genomra jellemző fragmentumokat is megkaptuk.

Az O42, valamint O44 keresztezésekből származó, az O51 Kék és az O51 Sárga színekű, illetve a Bridge401 növényeknél A és C genomra jellemző fragmentumok is szintetizálódtak. Az O52 Zöld, az O52 Piros, az O52 Pink és O52 Karamazsin színekű mintáknál csak C genom fragmentumait kaptuk. Az O52 Zöld, az O52 Pink és az O52 Karamazsin színekű, valamint a Bridge404 minták eredményei megegyeznek a COS015 és a COS264 primerpárnál tapasztalhatóval.

A COS420 primerpárral folytatott második PCR reakciót követően (18. ábra (F), 6. táblázat):

- Sajnos a non templát is kaptunk fragmentumot
- Az Orankin (B. rapa – A), Karalábé (B. oleracea – C) kontroll mintáknál eltérő méretű fragmentumokat amplifikált a primer pár.
- Az F1 (AC) kontroll mintánál pedig A és C genomra jellemző fragmentumokat is megkaptuk.

Az 5-ös zsebbe feltehetőleg nem került templát. A detektálás részleteiben pedig nem értékelhető, nagy valószínűséggel a futtatás hibája miatt.

A COS424 primerpárral folytatott első PCR reakciót követően (18. ábra(G), 6. táblázat):

- A non templátnál három fragmentumot is kaptunk, a gélkép nem értékelhető.

A COS424 primerpárral folytatott PCR reakciót követően (18. ábra (H), 6. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum.
- Az Orankin (*B. rapa* – A), Karalábé (*B. oleracea* – C) kontroll mintáknál eltérő méretű fragmentumokat amplifikált a primer pár. F1 (AC) kontroll mintánál az elvárásokkal ellentétben csak A genom specifikus fragmentum látható. A kontrol mintákon felül csak A genomra jellemző fragmentumok szintetizálódtak eltérő hosszúságban, részleteiben a gélkép nem értékelhető.

4.5 A BraOR és BolCRTISO primerpárok Touchdown-PCR eredményei

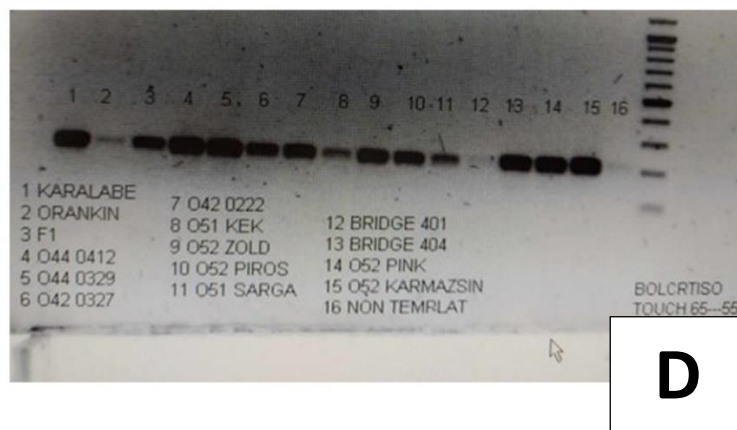
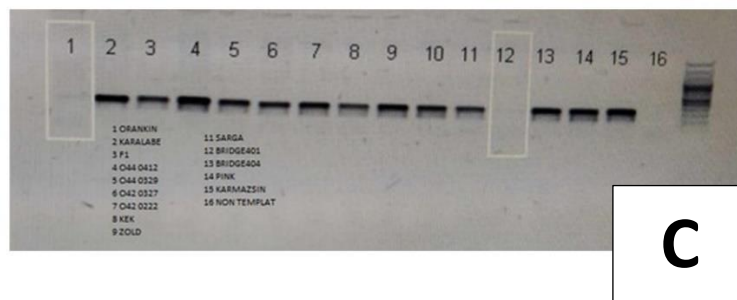
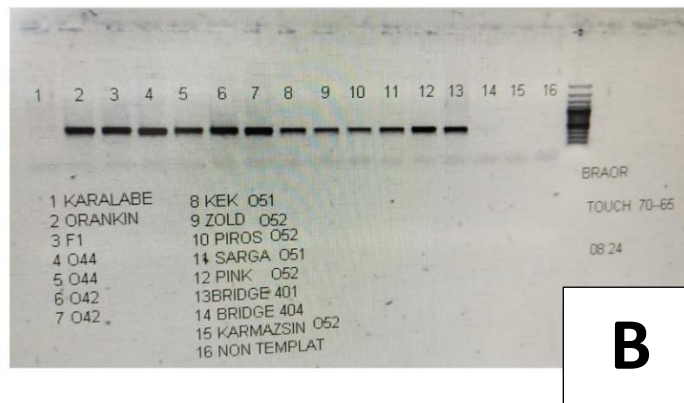
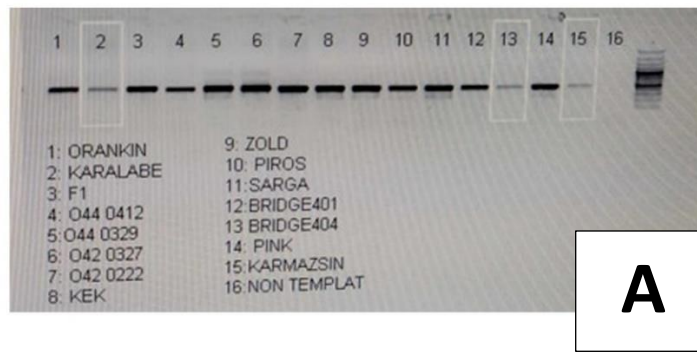
A BraOR primerpár a kínai kel narancssárga mutáns CRTISO1 gén jelenlétében ad terméket, *B. oleracea* mintákban nem várható amplikon.

Az eredmények a BraOR primerpárral futatott első PCR reakciót követően (19. ábra (A), 7. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum
- Ahogy Karalábé esetében sincs amplikon

Az O52 Karmazsin színekódú, valamint a Bridge404 minták esetében nem kaptunk fragmentumot.



19. ábra: 1%-os agarózgél EtBr-al festve, MM: GeneRuler™ 100+ bp DNA Ladder: **(A) BraOR primerpár Touchdown PCR 1**, 65 – 56 °C, mintasorrend: 1 Orankin, 2 Karalábé, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(B) BraOR primerpár Touchdown PCR 2**, 70 - 65 °C, mintasorrend: 1 Karalábé, 2 Orankin, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 O52 Pink, 13 Bridge401, 14 Bridge404, 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(C) BolCRTISO primerpár Touchdown PCR 1**, 70 – 61 °C, mintasorrend: 1 Orankin, 2 Karalábé, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát; **(D) BolCRTISO primerpár Touchdown PCR 2**, 65 – 55 °C, mintasorrend: 1 Orankin, 2 Karalábé, 3 F1, 4 O44, 5 O44, 6 O42, 7 O42, 8 O51 Kék, 9 O52 Zöld, 10 O52 Piros, 11 O51 Sárga, 12 Bridge401, 13 Bridge404, 14 O52 Pink 15 O52 Karmazsin, 16 Non templát.

A BraOR és BolCRTISO primerpárokkal folytatott Touchdown-PCR reakciók eredményeit a 7. táblázat foglalja össze. Adott genom specifikus fragmentum jelenlétét a gélen „+” jellel, hiányát pedig „-” jellel rögzítettük. Az „na.” tartalmazó cellák esetében nem működött a PCR reakció.

7. táblázat: a BrOR és BolCRTISO primerpárok PCR eredményei

		Primerpár	
		BraOR	BolCRTISO
PCR reakció	Növény		
1	Non templát	-	-
1	Karalábé	-	+
1	Orankin	+	-
1	F1	+	+
1	Bridge_401	+	-
1	Bridge_404	-	+
1	O42(02.22)	+	+
1	O42(03.27)	+	+

1	044(03.29)	+	+
1	O44(04.12)	+	+
1	O51 Kék	+	+
1	O51 Sárga	+	+
1	O52 Karmazsin	-	+
1	O52 Pink	+	+
1	O52 Piros	+	+
1	O52 Zöld	+	+
2	Non templát	-	-
2	Karalábé	-	+
2	Orankin	+	-
2	F1	+	+
2	Bridge_401	+	-
2	Bridge_404	-	+
2	O42(02.22)	+	+
2	O42(03.27)	+	+
2	044(03.29)	+	+
2	O44(04.12)	+	+
2	O51 Kék	+	+
2	O51 Sárga	+	+
2	O52 Karmazsin	-	+
2	O52 Pink	+	+
2	O52 Piros	+	+
2	O52 Zöld	+	+

Az eredmények a BraOR primerpárral futatott második PCR reakciót követően
(19. ábra (B), 7. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum
- Ahogy Karalábé esetében sincs amplikon

Hasonlóan az első ismételés eredményeihez az O52 Karmazsin színekódú, valamint a Bridge404 növényeknél nincs amplifikáció. A második ismételés során alkalmazott Touchdown 70 - 65 °C PCR protokollal már *B. oleracea* háttérben sem tapasztalhatóak halvány fragmentumok. Ezen hőmérsékleteken a PCR reakció jóval meggyőzőbb eredményekhez vezet.

A Bol-CRTISO1 primerpár használatakor a *B. oleracea* genomjára jellemző karotinoid izomeráz gén jelenlétekor kaphatunk fragmentumot.

Az eredmények a BolCRTISO primerpárral futatott első PCR reakciót követően (19. ábra (C), 7. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum
- Ahogy Orankin esetében sincs amplikon

Bridge401 növényénél nem detektálható fragmentum. Az F1 (AC), az O42, az O44, az O51 és az O52 keresztezésekből származó, valamint a Bridge404 növények esetében láthatunk fragmentumot.

Az eredmények a BolCRTISO primerpárral futatott második PCR reakciót követően (19. ábra(D), 7. táblázat):

A várakozások szerint:

- A non templátnál nem jelent meg fragmentum
- Ahogy Orankin esetében sincs amplikon.

Hasonlóan az első ismételéshez Bridge401 növényénél nem detektálható fragmentum. Az F1 (AC), az O42, az O44, az O51 és az O52 keresztezésekből származó, valamint a Bridge404 növények esetében láthatunk fragmentumot. A második ismételés során alkalmazott Touchdown 65-55°C PCR protokollal ugyan intenzívebben fragmentumokat kaptunk, azonban *B. rapa* háttérben is detektálható egy halvány fragmentum.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Ugyan PCR-technikára kifejezetten alkalmas DNS preparátumokat kaptunk az izolálást követően, azonban az O51 és O52 növények esetében alacsonyabb volt a genomi DNS koncentráció (5. táblázat). A DNS kivonást az embriómentés későbbi fázisában, a már fejlettebb növényeken, nagyobb tömegű növényanyagból végezve feltehetőleg magasabb koncentrációkat kaptunk volna. Utóbbi pedig meggyőzőbb PCR eredményeket adhat, valamint hígítás esetén számos PCR reakció összeállítható egyazon preparátumból.

Célkitűzésünk volt a COS markerek PCR protokolljának optimalizálása, segítve ezzel a későbbi keresztezésekből származó növényanyagok korai szelekcióját a genom összetétel tekintetében.

Első megközelítésben a Gradiens-PCR reakciók minimum és maximum primer tapadási hőmérsékleteit a COS primerpárok kalkulált alacsonyabb tapadási hőmérséklete alatt 0.5 °C-al, valamint a magasabb tapadási hőmérséklet felett 0.5 °C-al állítottuk be (4. táblázat). Ezek a hőmérsékletek mindegyik COS primerpár esetében alacsonynak bizonyultak, mivel a legmagasabb hőmérsékleteken is detektáltunk fragmentumot (17. ábra). Az F1 (AC) növény esetében pedig 3 fragmentumot kaptunk a COS015 és a COS264 primerpárokkal (17. ábra). A COS015, a COS264 és a COS420 primerpárokkal magasabb primer tapadási hőmérsékleteken ismételtük meg a Gradiens-PCR reakciót (17. ábra). A COS424 primerpárnál az első Gradiens-PCR (17. ábra), illetve a korábban elvégzett Touchdown-PCR reakciók eredményeire támaszkodtunk a továbbiakban. A megismételt Gradiens-PCR reakciók során mindegyik primer tapadási hőmérsékleten kaptunk fragmentumot (17. ábra.), ugyanakkor érdemes lett volna F1 (AC) növényből izolált DNS preparátummal összeállítani a Gradiens-PCR reakciókat, hogy lássuk melyik hőmérsékleten detektálható a 3 helyett, F1 egyedeknél elvárt 2 fragmentum.

Ezt követően a legutóbbi keresztezések során létrehozott növényeket (1. táblázat) teszteltük a genomösszetételre, valamint a narancs génre nézve Touchdown-PCR reakciók segítségével. A Touchdown-PCR reakciók primer tapadási hőmérsékleteit, a Gradiens-PCR reakciókra, illetve a COS424, a BraOR, és a BolCRTISO primerpárok esetében a korábbi eredményekre alapoztuk. A COS015, a COS264 és a

COS420 primerpárokhoz, egyrészt a Gradiens PCR eredményeket szem előtt tartva, másrészt optimalizálva a PCR gépek kihasználtságát, azonos primertapadási hőmérsékleteket állítottunk be. Mind a COS, mind a BraOR és BolCRTISO primerpárokkal a Touchdown-PCR reakciókat két ismétlésben végeztük.

Ugyan a keresztezésekben lévő növényeket tekintve releváns következtetéseket tudunk levonni, mindenképp szükséges a továbbiakban a Touchdown-PCR reakciók megismétlése, ami jelen dolgozat kereteit és lehetőségeit meghaladja. A COS15 primerpárral végzett Touchdown-PCR reakciók során F1 (AC) növényél csak A genomra specifikus fragmentum szintetizálódott (18. ábra, 6. táblázat). A COS420 primerpár esetében a non templátnál is detektálható fragmentum. A COS264, a BraOR és a BolCRTISO primerpárokkal pedig csak egy-egy elfogadható eredményt kaptunk adott hőmérsékleteken, amit szükséges megismételni a teljes bizonyossághoz. A COS424 primerpárokkal végzett vizsgálatok nem vezettek eredményre (18. ábra, 6. táblázat). Ezen primerpárral érdemes lehet további Gradiens-PCR reakciókat tervezni, a megfelelő primer tapadási hőmérsékletek megismeréséhez.

Galli Zsolt nemesítő célja, hogy a visszakeresztezések során *B. rapa* kromoszómái eliminálódjanak, a mutációt hordozó kromoszóma régió viszont interkalálódjon *B. oleracea* kromoszómáinak valamelyikébe.

Kizárólag *B. oleracea* genomra jellemző fragmentumok szintetizálódtak (18. ábra, 6. táblázat):

- Az O52 Pink, valamint a Bridge404 növényeknél a COS015, a COS264 és a COS420 primerpárokkal
- Az O52 Zöld, valamint az O52 Karmazsin növények esetében a COS264 és COS420 primerpárokkal
- Az O52 Piros növényénél COS420 primerpárral

A BraOR primerpár a kínai kel narancssárga mutáns CRTISO1 gén jelenlétében ad terméket. Eredményeink alapján az O52 Karmazsin és a Bridge404 növényekben nincs jelen a mutáns CRTISO1 gén. A Touchdown-PCR második ismétlése során alkalmazott Touchdown 70 - 65°C protokollal már *B. oleracea* háttérben sem detektáltunk fragmentumot (19. ábra, 7. táblázat). A további vizsgálatok során célszerű ezzel a protokollal tervezni a PCR reakciót. A BolCRTISO primerpárral folytatott PCR reakciók során *B. oleracea* genomjára jellemző karotinoid izomeráz gén jelenlétekor

kaphatunk fragmentumot. Ez a Bridge401 növény esetében nem volt detektálható (19. ábra, 7. táblázat).

A további keresztezések szempontjából a legnagyobb jelentőséggel bíró növények az O52 Pink, az O52 Zöld és az O52 Piros. Kiváltképp az az O52 Pink és az O52 Zöld, amelyek esetben több különböző COS primerpárral is csak *B. oleracea* genomra jellemző fragmentumokat kaptunk (19. ábra, 7. táblázat). Ezen növényeket érdemes lehet flow citometriás vizsgálatnak is alávetni a későbbiekben, hogy még pontosabb képet kapjunk a genomösszetételről. A keresztezéseket tekintve elmondható továbbá, hogy ezek a növények heterozigóta formában ugyan, de hordozzák a mutáns CRTISO1 gént, mivel mind a BraOR, mind a BolCRTISO primerpárokkal detektáltunk fragmentumot (19. ábra, 7. táblázat). Az O52 Karmazsin növény a genomösszetétel szempontjából ígéretes, a további keresztezésekből azonban javasolt kizárni, a mutáns narancs gén hiánya miatt (19. ábra, 7. táblázat). A Bridge növények eredetéről nincs pontos információnk, feltehetőleg átmenetet képeznek *B. oleracea* és *B. rapa* között. Bridge401 növényrel csak *B. rapa* genomra jellemző, a Bridge404 növényrel pedig csak *B. oleracea* genomra jellemző fragmentumokat kaptunk a COS primerekkel (18. ábra, 6. táblázat). A BolCRTISO primerpárral pedig a Bridge401 növény DNS preparátuma nem adott terméket (19. ábra, 7. táblázat). Utóbbiak alapján elmondható, hogy a Bridge növényekkel célszerű lehet részletesebb vizsgálatokat végezni a genomösszetételre nézve, a soron következő keresztezések kijelölése előtt.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Galli Zsolt növénynemesítő egy olyan fejeskáposzta (*B. oleracea* – C genom) létrehozását indította el hagyományos nemesítés eszközeivel, amelynek belső leveleiben β -karotin halmozódik fel. A β -karotin szervezetünk számára nélkülözhetetlen molekula, egészségmegőrző szerepe bizonyított számos krónikus betegség megelőzésében. A levelekben történő β -karotin felhalmozás további, nem kevésbé jelentős hozadéka a színváltozás. A zöltségek színei, formái és illatanyagai nagy mértékben befolyásolják a vásárlói szokásokat. Az újdonság, a megszokottól eltérő szín komoly előnyt jelenthet a piaci bevezetést tekintve.

Célkitűzéseink közt szerepelt az újonnan regenerált hibridek genomösszetételének vizsgálata COS (Conserved Ortholog Set) markerekkel, valamint a már meglévő narancssárga szín primerpárjainak tesztelése szelekciós szempontból.

Tizenöt növény leveléből izoláltunk genomi DNS-t, majd Gradiens- és Touchdown-PCR reakciókat végeztünk a négy COS, valamint a Braor és BolCRTISO primerpárokkal. A Gradiens és Touchdown-PCR reakciók eredményeiből releváns következtetéseket tudtunk levonni az optimális primertapadási hőmérsékletek meghatározásában.

A nemesítő célja, hogy a visszakeresztezések során *B. rapa* kromoszómái eliminálódjanak, a mutációt hordozó kromoszóma régió viszont interkalálódjon *B. oleracea* kromoszómáinak valamelyikébe. A további keresztezések szempontjából a legnagyobb jelentőséggel bíró növények az O52 Pink és az O52 Zöld, amelyek esetében több különböző COS primerpárral is csak *B. oleracea* genomra jellemző fragmentumokat kaptunk. Ugyanezen hibridek heterozigóta formában hordozzák a mutáns CRTISO1 gént, mivel mind a BraOR, mind a BolCRTISO primerpárokkal detektáltunk fragmentumot. Az O52 Karmazsin növény a genomösszetétel szempontjából ígéretes, a további keresztezésekből ellenben javasolt kizárni, a mutáns narancs gén hiánya miatt. A Bridge növények átmenetet képeznek *B. oleracea* és *B. rapa* között, azonban eredetükről nincs pontos információ. Az eredményeink alapján elmondható, hogy a Bridge növényekkel célszerű lehet részletesebb vizsgálatokat végezni a genomösszetételre nézve a soron következő keresztezések kijelölése előtt.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni feleségemnek és fiamnak, támogatásuk nélkül a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönöm a rengeteg segítséget konzulensemnek Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kittinek, aki szakértelmével, időt és energiát nem kímélve támogatta a munkámat.

Továbbá szeretném megköszönni a támogatást Dr. Galli Zsoltnak, aki elindította és koordinálja a leveleiben β -karotin felhalmozó fejeskáposzta nemesítését, valamint Czinege Dórának, aki a keresztezéseket felügyelte és a kísérlethez szükséges növényanyagot biztosította.

Köszönettel tartozom felettesemnek, Stréb Péternek. Az egyetemi évek alatt nyújtott támogatásáért és rugalmasságáért.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Balázs S. (2002) Zöldségtermesztők kézikönyve. Mezőgazda kiadó. Budapest.
2. Ben-Ari G., Uri Lavi (2012) Marker-assisted selection in plant breeding. Plant biotechnology and Agriculture. 163-184 p.
3. Cazzonelli I. C., Pogson J. B. (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. Trends Plant Science. 15., 266–274 p.
4. Collins, A. R. (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. Bioessays. 238–246 p.
5. Conn P. F., Schalch W., Truscott G. (1991) The singlet oxygen and carotenoid interaction. Journal of Photochemistry and Photobiology. 11, 41-47 p.
6. Crisp P., Walkey D. G. A., Bellman E., Roberts E. (1975) A mutation affecting curd colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* DC). Euphytica. 24, 173–176 p.
7. Cuttriss A. J., Chubb C. A., Alawady A., Grimm B., Pogson B. J. (2007) Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*. Functional Plant Biology. 663-672 p.
8. Edge R., McGarvey D. J., Truscott T. G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants – a review. New Trends in Photobiology. 189-200 p.
9. Ellison S. L. (2016) Carotenoid: Physiology. Encyclopedia of Food and Health.
10. Eroglu A., Kopec E. R., Al'Alibri S. I., Crook N. (2022) Carotenoids and their health benefits as derived via their Interactions with gut microbiota, advances in nutrition, 14, 1-2 p.
11. Feng H., Li Y., Liu Z., Liu J. (2012) Mapping of or, a gene conferring orange color on the inner leaf of the Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Molecular Breeding. 29, 235-236 p.
12. Fulton T. M., Hoeven R., Eanetta N. T., Tanksley S. D. (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. Plant Cell. 14, 1457–1467 p.
13. Garibyan L., Avashia N. (2013) Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). J Invest Dermatol.

14. Gautam M., Ge X., Li Z. (2014) Brassica. Alien gene transfer in crop plants volume 2. Springer. New York. 424 p., 207–229. p.
15. Guo-Liang J. (2013) Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants. Plant Breeding from Laboratories to Fields. Intechopen.
16. Gupta S. K., Pratap A. (2007) History, origin and evolution. Advances in botanical research-rapeseed breeding. Springer. Berlin. 464, 1–20. p.
17. György Zs., Halász J., Hegedűs A., Oláh R., Pedryc A. (2015) A genetika és a növénynevelés alapjai. Egyetemi jegyzet. Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar. 62, 97 p.
18. Háda M. (2012) Vízoldható karotinoidok és karotinoid dendrimerek előállítása. Doktori értekezés.
19. Hannoufa A., Hossain Z. (2012) Regulation of carotenoid accumulation in plants. Biocatal Agric Biotechnol. 198–202 p.
20. Heszky L., Galli Zs. (2008) A genetika alapjai. Szent István Egyetem. Genetika és Biotechnológiai Intézet. Gödöllő. 99 p.
21. Hirschberg J. (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. Current Opinion in Plant Biology. 4, 210–218 p.
22. Isaacson T., Ohad I., Beyer P., Hirschberg J. (2004) Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. Plant Physiology. 136, 4246-4255 p.
23. Isaacson T., Ronen G., Zamir D., Hirschberg J. (2002) Cloning of tangerine from tomato reveals carotenoid isomerase essential for the production of β -karotin and Xanthophylls in plants. The Plant Cell. 14, 333-342 p.
24. Jeong Y. M., Chung W. H., Chung H., Kim N., Park B. S., Lim K. B., Yu H. J., Mun J. H. (2014) Comparative analysis of the radish genome based on a conserved ortholog set (COS) of Brassica. Theoretical and Applied Genetics. 127, 1975-1989 p.
25. Kiss E. (1999) Növényi molekuláris genetika I. Gödöllői Agrártudományi Egyetem. Genetika és Növénynevelés Tanszék. Gödöllő. 89 p.
26. Korbie D. J., Mattick, J. S. (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature protocols. 3, 1452-1456 p.

27. Li P., Zhang S., Li F., Zhang H., Liu X., Wu J., Wang X., Sun R. (2015) Carotenoid identification and molecular analysis of carotenoid isomerase-encoding BrCRTISO, the candidate gene for inner leaf orange coloration in Chinese cabbage. *Molecular Breeding*. 35, 2-3 p.
28. Manton I. (1932) Introduction to the general cytology of the Cruciferae. *Annals of Botany*. 46 509–556 p.
29. María E. C., Fernando C.-M., Sara O., Francisco R. B. P., Antonio D. H. (2021) Advances in Breeding in Vegetable Brassica rapa Crops. *Brassica Breeding and Biotechnology*. IntechOpen. London. 174 p.
30. Martin A., Kwok C., Michaela K., Petr B. (2007) Ancestral chromosomal blocks are triplicated in *Brassicaceae* species with varying chromosome number and genome size. *plant physiology*. 402-410 p.
31. Matsumoto E., Yasui C., Ohi M., Tsukada, M. (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp. pekinensis*). *Euphytica*. 104, 79–86 p.
32. Misawa N. (2009) Pathway engineering of plants toward astaxanthin production. *Plant Biotechnology*. 26, 93–99 p.
33. Molnár P. (2013) Karotinoidok és szteroidok. Pécsi Tudományegyetem
34. Monostori T., Csiba A. (2018) Mezőgazdasági biotechnológia. Szegedi Tudományi Egyetem. Hódmezővásárhely.
35. Nagaharu U. (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*. 389-452 p.
36. Pance M. Á. (2023) A Kínai kel narancssárga mutációjának átvitele káposztafélékbe embryo-rescue módszerrel. Diplomadolgozat, MATE, Gödöllő, 38 p.
37. Park H., Kreunen S., Cuttriss A. J., Della D., Pogson B. J. (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell*. 14,321–332. p.
38. Pepó P. (2010) Növénynevelés. Agrármérnöki MSc szak egyetemi jegyzet.

39. Podsedek A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. Food Science and Technology. 40, 1-11 p.
40. Pongrácz E. (2021) A Kínai kel narancssárga mutációjának átvitele káposztafélékbe embriómentéssel. TDK dolgozat, MATE, Gödöllő, 50 p.
41. Prakash S., Bhat S. R., Quiros C. F., Kirti P. B., Chopra V. L. (2009) *Brassica* and its close allies: cytogenetics and evolution. Plant Breeding. 31: 21–187 p.
42. Rajalakshmi S. (2017) Different types of PCR techniques and its applications. International Journal of pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences. 7, 285-292 p.
43. Ribaut J. M., Vicente de M.C., Delannay X. (2010) Molecular breeding in developing countries: challenges and perspectives. Current Opinion in Plant Biology. 13, 1-6 p.
44. Ruixing Z., Jiahao Z., Chao L., Qiming P., Saeed U. H., Walid F. A. M., Fang F., Lugang Z., Baohua L. (2023) The Accumulation of Health-Promoting Nutrients from Representative Organs across Multiple Developmental Stages in Orange Chinese Cabbage. Plants. 12, 2120 p.
45. Sandmann, G. (2001) Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. Trends in Plant Science. 6, 14-17 p.
46. Schmidt D. C., Umeno D., Arnold F. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathway. Natural Biotechnology. 18, 750–753 p.
47. Schmidt R., Bancroft, I. 2011 Perspectives on genetics and genomics of the *Brassicaceae*. Springer. New York. 677, 617-632 p.
48. Schmidt-Dannert C., Umeno D., Arnold F. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. Natural Biotechnology. 18, 750–753
49. Seohee L., Sang-Choon L., Dong H. B., Jee Y. P., Jong H. L., Hyun O. L., Sang H. S., Tae-Jin Y. (2014) Association of molecular markers derived from the BrCRISTO1 gene with polycopene-enriched orangecolored leaves in Brassica rapa. Theoretical and Applied Genetics 127, 179–191 p.
50. Shuacang S., Fenglan Y., Yangyun Z. J. W. F., Deshuang Y., Xiuyun Z., Weihong W. (2015) Loss of function of the carotenoid isomerase gene BrCRTISO confers orange color to the inner leaves of chinese cabbage (*Brassica rapa L. ssp. pekinensis*). Plant Molecular Biology Reporter. 33, 648 – 659 p.

51. Staub J.E., Serquen F. C., Gupta M. (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Horticultural Science* 31, 729–741 p.
52. Szűcs K. M. (2015) Kodomináns marker fejlesztése a kínai kel narancsszínű mutációjára és a mutáció átvitele *Brassica oleracea*-ba embryo rescue módszerrel. Diplomamunka, SZIE, Gödöllő, 49p.
53. Von Lintig J., Welsch R., Bonk M., Giuliano G., Batschauer A., Kleinig H. (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Journal*. 12, 625–634 p.
54. Watanabe M., Musum, K., Ayugase J. (2011) Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage. *Food Science and Technology*. 44, 1971-1975 p. 22.
55. Wills R. B. H., Ranga A. (1996) Determination of carotenoids in Chinese vegetables, *Food Chemistry*. 56. 451-457p.
56. Yim C. W., Swian L. M., Dogna M., An H. (2022) The final piece of the Triangle of U: Evolution of the tetraploid *Brassica carinata* genome. 34; 4143–4172 p.
57. Zandberg J.D., Fernandez C.T., Danilevicz M.F., Thomas W.J.W., Edwards D., Batley J. (2022) The Global Assessment of oilseed *Brassica* crop species yield, yield stability and the underlying genetics. *Plants*, 11 2170 p.
58. Zhang J., Li H., Zhang M., Hui M., Wang O., Li L., Zhang L. (2013) Fine mapping and identification of candidate Br-or gene controlling orange head of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Molecular Breeding*. 32, 799-805 p.
59. Zhang J., Yuan H., Fei Z., Pogson B., Zhang L., Li L. (2015) Molecular characterization and transcriptome analysis of orange head Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Springer*. 14-23 p
60. Zoshuk N.V., Badaeva E.D., Zelenin A. V. (2002) History of modern chromosomal analysis differential staining of plant chromosomes. *Russian Journal of Developmental Biology*. 34 1-13 p.
61. http1: Cabbage production <https://worldmapper.org/maps/cabbage-production/>

62. http2: Asia-pacific-cabbage-and-other-brassicas-production-by-country
<https://www.statista.com/statistics/658175/asia-pacific-cabbage-and-other-brassicas-production-by-country/>
63. http3: Egyre csökken a káposztafélék hazai termesztése
<https://agrokep.vg.hu/gazdalkodas/novenytermesztes/egyre-csokken-a-kaposztafelek-hazai-termesztese-19860/>
64. http4: Gradient-PCR <https://www.drugdiscoveryonline.com/doc/using-gradient-pcr-to-determine-the-optimum-a-0002>

9. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: 1. táblázat: COS015 Gradiens PCR 1 primer tapadási hőmérsékletek (°C)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
52.0	52.5	52.9	53.4	53.8	54.3	54.7	55.2	55.6	56.1	56.5

2. számú melléklet: 2. táblázat: COS264 Gradiens PCR 1 primer tapadási hőmérsékletek (°C)

A	B	C	D	E	F	G	H
56.1	56.1	55.9	55.7	55.4	55.2	55.1	55.0

3. számú melléklet: 3. táblázat: COS420 Gradiens PCR 1 annealing hőmérsékletei (°C)

A	B	C	D	E	F	G	H
56.8	56.6	56.2	55.7	55.0	54.5	54.1	53.9

4. számú melléklet: 4. táblázat: COS424 Gradiens PCR annealing hőmérsékletei (°C)

A	B	C	D	E	F	G	H
53.8	53.6	53.3	52.9	52.3	51.8	51.5	51.3

5. számú melléklet: 5. táblázat: COS015, COS264, COS420 Gradiens PCR 2 primer tapadási hőmérsékletek (°C)

A	B	C	D	E	F	G	H
65.0	64.3	63.2	61.5	59.4	57.7	56.5	55.9

1. sz. függelék:

NYILATKOZAT

Szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve:	Poór Kristóf
A Hallgató Neptun kódja:	IRHMSC
A dolgozat címe:	Marker alapú szelekció a narancssárga fejeskáposzta előállításában
A megjelenés éve:	2023
A konzulens intézetének neve:	Genetika és Biotechnológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve:	Genetika és Genomika Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat 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 repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2023 év 10. hó 31. nap


Hallgató aláírása

2. sz. függelék:

NYILATKOZAT

Poór Kristóf (név) (hallgató Neptun azonosítója: IRHMSC) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

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

Kelt: Gödöllő, 2023. 11. 05.

Tóth-Keregy A. Lili

belső konzulens