

DIPLOMADOLGOZAT

Dobóvári Éva

2024.



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Genetika és Biotechnológia Intézet

Mezőgazdasági biotechnológia mesterképzési szak

**A KAJSZI HIDEGTŰRÉSÉNEK MOLEKULÁRIS GENETIKAI
VIZSGÁLATA**

Belső konzulens: Bedő Janka
egyetemi tanársegéd

Belső konzulens

intézete/tanszéke: Genetika és Biotechnológia Intézet

Külső konzulens: Mendel Ákos
tudományos munkatárs

Készítette: Dobóvári Éva

Gödöllő

2024

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés és célkitűzések	4
2	Szakirodalmi áttekintés	6
2.1	Termesztési nehézségek	6
2.2	Egyes kajszi fajták hidegtűrési jellemzői	7
2.3	Molekuláris markerek	10
2.3.1	Népszerű random technikák	11
2.3.2	Specifikus primerek.....	13
2.3.3	Kutatásban használt markerek.....	15
3	Anyag és módszer.....	21
3.1	DNS kivonás	21
3.2	DNS minták minőségellenőrzése.....	22
3.3	PCR	23
3.3.1	PCR SCoT markerekkel.....	23
3.3.2	PCR COR47 primerpárokkal	25
3.4	Agaróz gélelektroforézis	27
3.5	Kiértékelés	28
4	Eredmények.....	29
4.1	SCoT marker analízis	29
4.2	Analízis COR47 primerpárokkal	36
5	Következtetések és javaslatok	45
5.1	SCoT markerek használata	45
5.2	COR47 primerpárok használata	46
6	Összefoglalás	48
7	Irodalomjegyzék.....	50

1 Bevezetés és célkitűzések

A kajszibarack a török hódoltság idején érkezett hazánkba, azóta egyik legkedveltebb gyümölcsünké vált. Világszerte a harmadik legfontosabb csonthéjas gyümölcsfaj, Magyarországon is jelentős mennyiségben termesztik. A globális termőterület nagyjából 560 ezer hektár, az éves termelés eléri a 4 millió tonnát. A kajszitermelés területe évről évre növekszik, ami a termés mennyiségében is megmutatkozik. Az egyenletes és magas minőségű termék elengedhetetlen a piaci stabilizációhoz. A magyar kajszinak nagy előnye, hogy a spanyol, görög és olasz kajszik után érik, ez lehetővé teszi, hogy meg tudjunk jelenni a piacokon.

Legtöbbször frissen, fagyasztva, aszalva fogyasztjuk, de készülhet belőle többek között lekvár, befőtt és gyümölcslé is. A magjából sajtolt olajat magas beltartalmi értékei miatt (A és E vitamin) a kozmetikai ipar is szívesen használja. Melegkedvelő növény, tőlünk északabbra nem igazán él meg. Termesztése a nálunk jellemző mérsékelt övi éghajlaton nehézségeket rejt magában. A hideg telek és virágzáskori tavaszi fagyok szinte minden évben kihívást jelentenek a gazdáknak, mert a termésmennyiség a gondos művelés és fagyvédelmi intézkedések ellenére is jelentősen lecsökkenhet.

A jelenleg ismert termesztési nehézségeken túl a globális éghajlatváltozással is számolnunk kell, melynek hatásait egy ideje már saját bőrünkön tapasztalhatjuk. A kutatók hőmérséklet-emelkedésre figyelmeztetnek, emellett a mostanitól eltérő, szélsőséges időjárási viszonyokat jósolnak, melyek a megváltozott agroökoszisztémán keresztül kihatnak majd a mezőgazdaságra is.

Az extrém hideg és meleg időjárás váltakozása, a nagy hőmérséklet-ingadozás a növények élettani folyamatait önmagában is befolyásolhatja, emellett egyes kártevők, kórokozók eltűnhetnek, míg mások elszaporodhatnak, illetve újak jelenhetnek meg, ezzel növelve a termesztés kockázatát.

A fenntartható mezőgazdaság elvei a vegyszerek általi környezetterhelés csökkentését diktálják, így a jövőre nézve egyaránt megnövekedett szerepe lesz a fajták biotikus (kórokozók, kártevők) és abiotikus (hideg, meleg, szárazság) stresszekkel szembeni ellenállóságának.

A hazai nemesítők munkájának köszönhetően ma már a piacon számos kajszifajtát találhatunk, közöttük betegség ellenálló, rezisztens fajtákat és olyanokat is, melyek az ősi magyar fajtáknál

jobb fagyűrési képességgel rendelkeznek. A hagyományos nemesítési folyamat hosszú, több évet vagy akár egy évtizedet is felöllehet, azonban a növényi biotechnológia eszköztárát segítségül hívva ez töredékére csökkenthető. A marker asszisztált nemesítéssel (MAS) már a növényi fejlődés korai szakaszában a növény bármely részéből izolált DNS mintából szelektálhatunk a nemesítési programban hasznos tulajdonságokra. A forward genetika a növény morfológiai jellemzőit vizsgálva következtet a genotípusra, a reverz genetika lényege viszont az, hogy genotípusról következtetünk a fenotípusra. Ehhez molekuláris markereket használunk, melyek lehetnek a genom kódoló és nem kódoló szekvenciái is.

Nagy előnyük, hogy kifejeződésük nem függ sem a környezeti hatásoktól, sem a növény fejlettségi állapotától. A molekuláris markerek sokfélék lehetnek, az, hogy éppen milyen típust választunk, függ az adott céltól, elérhetőségtől és anyagi lehetőségektől is.

Jelen kutatásunkban célul tűztük ki, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kertészettudományi Intézetének Gyümölcsstermesztési Kutató Központjának Ceglédi Kutatóállomása által biztosított 18 kajszi genotípust elemezzük, meghatározzuk a polimorfizmusukat 13 start kodont célzó SCoT markerrel. Egy a közelmúltban megjelent publikáció alapján a COR47 gén összefüggésbe hozható a kajszi hidegtűrésével, így az általunk vizsgált növényeket a génre tervezett primerekkel is analizáltuk. Célunk, hogy a két különböző markerrendszer használatával kapott eredményeket szakirodalmi adatokkal összevetve esetlegesen kimutassunk a hidegtűréssel kapcsolatban álló DNS szakaszokat. Eredményeink alapján a markerek és genotípusok számának növelésével szeretnénk a jövőben olyan marker asszociációs vizsgálatokat végezni, amelyekkel hatékonyabbá tehető az új fajták nemesítése a különböző abiotikus stresszekkel, különösen a hidegstresszel szemben.

2 Szakirodalmi áttekintés

2.1 Termesztési nehézségek

A *Prunus armeniaca*, azaz kajszi rendszertani besorolását tekintve a zárvatermők törzsének *Rosaceae* (rózsafélék) családjába tartozik (National Center for Biotechnology Information, 2024a), azon belül a *Prunoideae* alcsalád tagja. Őshazája Ázsia. Hazánkban mintegy 5000 hektáron termesztik, ám a betakarított termésmennyiség nagyon változó lehet, ami a hideg teleknek, főként a virágzás utáni fagyoknak, illetve a nagy hőingásoknak tulajdonítható.

Az alacsony hőmérsékletnek számos negatív hatása van a reprodukív fejlődés folyamatára, amelyek következtében a termés mennyisége alacsonyabb lehet. Ezek közé tartozik például a rügyek és virágok befagyása, a pollen sterilitása, a pollentömlők és embriózsákok torzulása, valamint a gyümölcskötődés csökkenése (Németh, 2012). A kajszi olyan gyümölcsfaj, amelynek virágbiológiájával kapcsolatban számos probléma merül fel, a termés hozam pedig nem állandó és rendkívül alacsony, ami az éghajlati alkalmazkodás hiányának tulajdonítható (Viti et al. 2006).

A virágrügyfejlődés üteme és a virágzási időpont kritikus fontosságú a termésbiztonság szempontjából, mivel a fenológiai folyamatok előrehaladtával a reprodukív szervek egyre érzékenyebbek lesznek a fagyra. A fagy okozta károk kockázatát a lassabb virágrügyfejlődés és a későbbi virágzás jelentősen csökkentheti (Németh, 2012).

A növénynemesítés és agronómiai gyakorlatok fejlődése folyamatosan hozzájárul a globális termelés növekedéséhez. Azonban a termés hozamok növekedése jelenleg elmarad azoktól a céloktól, amelyeket a 2050-re prognosztizált globális népesség élelmiszerigényének kielégítésére tűztek ki. Különösen az abiotikus környezeti tényezőknek kitett növények, például a vízhiány, sósság és extrém hőmérséklet, gyakran csökkentett termés hozammal járnak. A hagyományos nemesítési programok általában a közel optimális feltételek mellett javítják a termés hozamokat, nem pedig kifejezetten a stresszes körülmények közötti stabilitásra összpontosítanak (Martin et al. 2019).

A gyümölcsösökben tapasztalható termés kiesés 80%-át a tavaszi fagyok okozzák. Bár a globális éghajlatváltozás összességében melegebb klímát eredményez, továbbra is jellemzőek maradnak a tavaszi, nagy lehúléssel járó, fagyos időszakok. A melegedés következtében

korábban bekövetkező virágzási időszak miatt a tavaszi fagyok a megszokottnál nagyobb károkat okozhatnak (Szabó, 2024).

2.2 Egyes kajszi fajták hidegtűrési jellemzői

A kajszi hidegtűrése egyre többet tanulmányozott terület. Az elmúlt 30 évben számos cikk, publikáció jelent meg a témában. A kutatási eredmények nagyban segíthetik a nemesítők munkáját a megfelelő szülő alanyok kiválasztásában, a fajtanemesítésben.

Egy 1998-1999-es szigetcsépi tanulmányban 20 kajszifajta virágrügyeinek fagyállóságát vizsgálták. A 'Bergeron' -16,81°C-os átlagos fagytűréssel a „jó fagytűrésű” kategóriába került, ezzel az 5. helyen végzett, míg a 'Ceglédi bíborkajszi' -15,55°C-os hőmérséklettel a rangsorban a 17. lett és „fagyérzékeny kategóriába” sorolták (Szalay, 2001).

Egy csaknem 10 évvel később kezdődött, 2007 és 2020 között zajló kutatás során a kajszifajták virágrügyeinek fagykárosodását vizsgálták a mélynyugalmi időszakban bekövetkezett lehúlések hatására. A fajtákat 1-től 5-ig osztályozták, ahol 1 a legrosszabb, 5 a legjobb hidegtűrési tulajdonságokat jelentette. A kutatás eredményeképp a 'Rózsakajszi C.1406' fajtát és a 'Bergeron'-t a legjobb hidegtűrési, azaz 5. kategóriába sorolták, a 'Harcot' fajta közepes (3) minősítést kapott, míg a 'Ceglédi bíborkajszi' az 1., azaz fagytűrés szempontjából legrosszabb kategóriába került (Szalay, et al. 2021).

A 'Bergeron' és a 'Harcot' fajták télállóságát az alábbi bekezdés tartalma is alátámasztja, ugyancsak itt olvashatunk a 'H-II. 45/58' remek fagytűrési tulajdonságairól is.

A 'Bergeron' fajtát, még a nehéz tél és tavasz után is, a jó termőhelyeken ritkítani kell, a 'Mandulakajszi' és bizonyos védett fekvésű fajták, mint például a 'Harcot' és a 'Harvee', jól teljesítettek. A kísérleti ültetvények (Cegléd, Helvécia, Szigetcsép) kedvezőtlen körülmények között helyezkednek el, szárazak és fagyjárta területeken, ami elsősorban az új fajták ellenőrzésére és edzettségük vizsgálatára alkalmas. Még a nehéz körülmények között is bizonyított fajták közé tartoznak az ipari feldolgozásra szánt 'H—II. 45/58', a nagyon korai érésű '447-1/11', a 'Kisinyovszkij rannyij', az '1153/54', a késői érésű 'H II. 20/6', a 'H-II. 6/42' és a késői, nagy gyümölcsű 'Selena' fajták. Egyes fajták, mint például a 'Polonais' nem bizonyultak megfelelőnek, és elpusztultak a fagyok miatt. Több ígéretes külföldi fajta sem bírta ki az adott időjárási viszonyokat (Horváth, 1994).

A 'Ceglédi bájos' a 'Ceglédi hajnalpír' és a 'Korai piros' keresztezés magoncpopulációjából származik. Mindkettő magyar tájfajta. Első virágai a 'Gönci 83' virágaival egy időben jelennek meg, amelyek nagymértékben fagytűrőek (Mendelné Pászti és Mendel, 2021a).

A 'Harval' 1969-ben a Harrow Kutatóállomáson a 'Veecot' és a 'HW435' keresztezéséből jött létre. A pollenszülőt 1968-ban szelektálták Harrow-ban egy New Jersey-i magoncból. Ez a genotípus egy késői szezonban termesztett, hidegtűrő, vonzó, kemény húsú, kiváló minőségű fajta, melyet végül 1989-ben vezettek be és Ontario friss piacára szánták (Layne, 1991).

Mendelné Pászti Edina és Mendel Ákos (2021) 36 kajszi genotípust vizsgáltak. Évről-évre fajtánként 100-100 virágrügyből mutatták ki a megtermékenyítésre alkalmatlan virágok százalékos arányát. A vizsgálatok alátámasztották, hogy míg a régi hagyományos magyar kajszi fajták kevésbé álltak ellen a tavaszi fagyoknak ('Ceglédi bíborkajszi'), addig az újabb fajták jobb tulajdonságokkal rendelkeznek a hidegtűrést illetően. Ebbe a kategóriába sorolható a 'Ceglédi szilárd', a 'Ceglédi zamatos' és a 'H-II- 50/58' jelű hibrid is (Mendelné Pászti és Mendel, 2021b).

A 'Farcló' egy késői virágzású, öntermékeny fajta, fiatal gyümölcsei ellenállnak a fagynak (Krška és Vachůn, 2016). A Carmingo sorozat utolsó érésű, védett tagja. 55 nappal a 'Bergeron' után érik (International Plant Selection, 2024).

A 'Bergeval' új francia nemesítésű, öntermékenyülő fajta. Későn, a 'Bergeronnal' egy időben virágzik, gyümölcsei lédúsak, június második felében érnek. Jó hidegtűrő képességgel rendelkezik, sharka vírus rezisztens kajszi (CEP Innovation, 2024).

A 'Magyar kajszi C. 256' fajtát Cegléden 1953-ban szelektálták Nyujtó Ferenc és munkatársai. Középidőben virágzik, öntermékenyülő. Téli és tavaszi lehülésre kevésbé érzékeny. A 'H-IV II/14' egy új késői virágzású, fagytűrő hibrid. Mendel Ákos szelektálta Cegléden. A 'H-III 10/21' jelű hibrid a 'H – II. 45/46' szabadtermékenyüléséből származik. A genotípust Kerek Mária szelektálta, jó hidegtűrő képességgel rendelkezik. Állami elismerése 2024-ben várható (Mendel, 2024).

A 'Tsunami' rendkívül korán, június elején érő, későn virágzó, magas terméshozamú sárgabarack. Franciaországból származik (Záhradníctvo Limbach, 2024).

A rendelkezésre álló szakirodalmi források alapján az általunk vizsgálatba vont genotípusok fagyűrési tulajdonságait az **1. táblázatban** foglaltuk össze. A későbbiekben a mintákat a genotípus melletti számmal azonosítjuk.

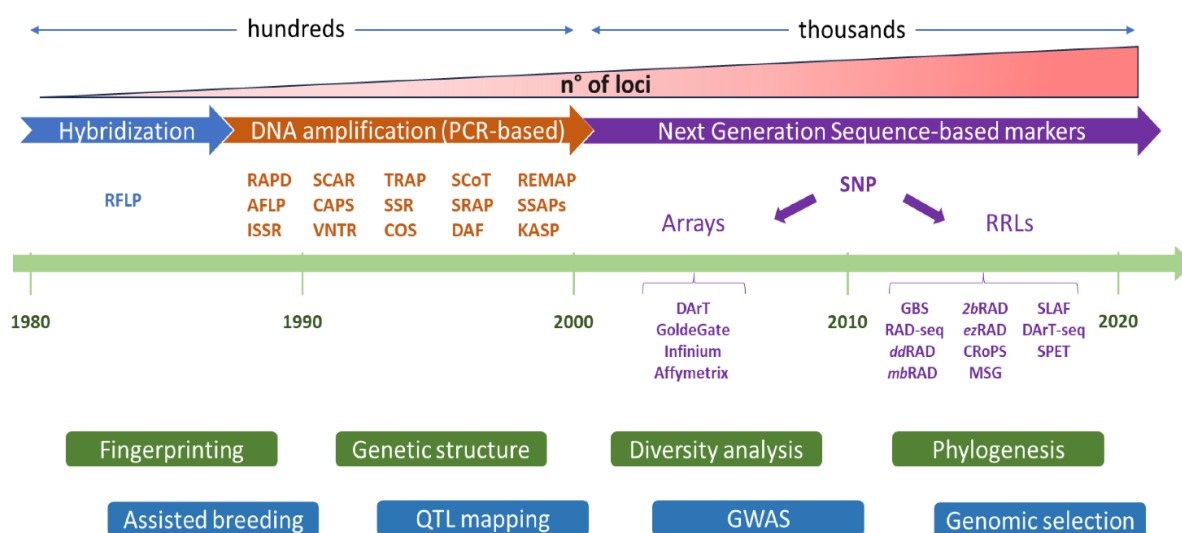
1. táblázat. A vizsgálatba bevont genotípusok fagyűrése szakirodalmi adatok alapján.
(Forrás: saját munka)

Ssz.	Genotípus	Virágrügyek fagyűrése				
		Igen gyenge	Gyenge	Közepes	Jó	Nagyon jó
1.	'Bergeval'				x	
2.	'Rózsakajsi C. 1406'					x
3.	'Bergeron'					x
4.	'Gönci 83'				x	
5.	'Ceglédi szilárd'			x		
6.	'Ceglédi zamatos'				x	
7.	'Magyar Kajsi C. 256'				x	
8.	'Ceglédi bájos'				x	
9.	'Ceglédi bíborkajsi C. 307'	x				
10.	'Ceglédi bíborkajsi'	x				
11.	'Farclo'				x	
12.	'Harcot'				x	
13.	'Harval'					x
14.	'H-IV. 2/14'				x	
15.	'H-III. 10/21'				x	
16.	'H-II. 45/58'				x	
17.	'H-II. 50/58'			x		
18.	'Tsunami'			x		

2.3 Molekuláris markerek

A növények meghatározásához kezdetben morfológiai bélyegeket használtak. Ilyen például a levél alakja, formája, összetettsége, mintázata, virágszín, koronaforma, gyümölcsforma, gyümölcsszín, porzók száma, csészelevelek száma stb. Ezek szabad szemmel jól látható, elkülöníthető tulajdonságok. Sztenderd morfológiai tulajdonságokkal azonban az egyedek elkülönítése nem könnyű. A morfológiai markerek a fenotípushoz kötődnek, azokkal csak a DNS kódoló szakaszairól kapunk információt, azonban ez a genomnak csupán kis százalékát adja. Molekuláris markerek a genom kódoló és nem kódoló szekvenciái is lehetnek. Fontos kiemelni, hogy a nem kódoló részről csak molekuláris markerekkel kaphatunk információt, mellyel a DNS egésze felhasználhatóvá válik az egyes genotípusok azonosítására. Az optimális molekuláris marker polimorf, kodomináns öröklődésű (a heterozigóták és homozigóták elkülöníthetők), a genomban gyakran és egyenletesen előfordul, olcsó, könnyen használható és helytől és időtől függetlenül ugyanazt az eredményt adja (a vizsgálat jól ismételhető). Tökéletes molekuláris marker azonban nem létezik. Mindig az adott kérdésfelvetés, a rendelkezésre álló ismeretek és erőforrások, technikai feltételek döntenek el, hogy milyen markerezési eljárást alkalmazunk (Chesnokov et al. 2020). A molekuláris markerek evolúcióját és azok felhasználását az **1. ábra** mutatja be.

1. ábra. A molekuláris markerek evolúciója és azok felhasználási területei.
(Forrás: (Tripodi, 2023))



A következőkben a PCR alapú markerekkel foglalkozunk, mely lehet ismert és ismeretlen (random) szekvencia.

2.3.1 Népszerű random technikák

A random markerek előnye, hogy nem szükséges előzetes ismeret a faj genomjáról. Ezek gyakran egyprimeres módszerek (nincs külön forward és reverz primer), melyek vagy kellően rövidek, vagy olyan ismétlődést tartalmaznak, amelyek biztosan megtalálhatók a genomban (mikroszatellitek vagy transzpozonok).

2.3.1.1 RAPD markerek

RAPD: Random Amplified Polimorphic DNA (random amplifikált polimorf DNS). A PCR megjelenése utáni első markerezési módszer. Domináns öröklődésű, a primerek rövidek, 6-8-10 bp hosszúak. PCR terméket csak abban az esetben kapunk, ha a primer mindkét szálon egymással ellentétes irányban beköt. Ismételhetősége az alacsony specifitás miatt vitatott, elképzelhető, hogy a sok kötőhelyből nem mindig találja meg az összeset. Amennyiben a két kötőhely nagyon messze van egymástól, elképzelhető, hogy nem kapunk terméket. Taq polimerázzal általában maximum 2kbp DNS szakaszt amplifikálhatunk. Minimum 10-20 primer alkalmazása javasolt és az eredményt az vizsgálatok összesítéséből vonjuk le. A PCR termékeket agaróz gél elektroforézissel választjuk szét, melynek kiértékelése szubjektív módon, prezencia-abszencia táblázattal történik (National Center for Biotechnology Information, 2024b).

2.3.1.2 ISSR technika

ISSR: Inter Simple Sequence Repeats (egyszerű szekvenciaismétlődések közötti régiók). Az egyszerű szekvenciaismétlődéseket más néven mikroszatelliteknek nevezzük, melyek közvetlenül egymás után, tandem módon ismétlődnek. Ezzel a markerrel két szomszédos mikroszatellit régió közötti részt vizsgálunk. Olcsó, egyszerű, gyors, egyprimeres módszer, mely általában 20 nukleotid hosszúságú, míg a vizsgált ismeretlen régiók néhány száz bázispárt ölelnek fel. Annak érdekében, hogy ugyanarról a régióról ne képződhessen különböző hosszúságú fragmentum, a primereket 1-2-3 db szelektív nukleotiddal horgonyozzuk ki. Domináns öröklődésű marker, a RAPD-nál megbízhatóbb (hosszabb, specifikusabb primerek, magasabb tapadási hőmérséklet). Agaróz gél elektroforézist igényel (Gemmil és Grierson, 2021).

2.3.1.3 AFLP módszer

AFLP: Amplified Fragment Length Polimorphism (amplifikált fragmentum hossz polimorfizmus). Ez a módszer ötvözi a PCR és a restrikciós enzimek használatát. A szekvenálás előretörése miatt ezt a technikát ma már kevésbé használják. A módszer első lépésében a DNS-t restrikciós endonukleázzal emésztjük meg, ezzel a DNS szakasz két végének szekvenciája ismertté válik. A túlnyúló néhány nukleotidhoz adaptor molekulát ligálunk, melyre primert tervezünk. A DNS szakaszt ezután PCR technikával felszaporítjuk (pre-szelektív PCR) második lépésben pedig szelektív nukleotidokkal meghosszabbított primerrel szelektív PCR-t végzünk, és csak ezután választjuk szét a fragmentumokat poliakrilamid gélen. Jól ismételhető, szekvenciaismeretet nem igénylő módszer. Amennyiben a vizsgálat során az egyik primert fluoreszcens jelöléssel látjuk el, akkor a kiértékelés ALF-Express elektroforézis készülékkel automatikusan elkészíthető (Vos et al. 1995).

2.3.1.4 MSAP módszer

MSAP: Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (metiláción alapuló amplifikált polimorfizmus). Ebben az esetben a DNS szekvenciában nincs különbség csak a DNS szálon lévő metil csoportok jelenlétében vagy hiányában. A *HpaII* és *MspI* restrikciós endonukleázok ugyanazzal a felismerőhellyel rendelkeznek (CCGG). Amennyiben a felismerőhelyen lévő bármely citozinon metil csoport található, a *HpaII* nem tud vágni, míg a külső citozin metiláltsága esetén az *MspI* enzim működése akadályozott. A PCR terméket poliakrilamid gélen választjuk szét (Chwialkowska et al. 2017).

2.3.1.5 SCoT markerek

SCoT: Start Codon Targeted Marker (startkodont célzó marker) viszonylag új technika. Kimondottan növényekre fejlesztették ki. Több mint 5000, növényekből izolált gén vizsgálata alapján megnézték, hogy az ATG startkodon előtt és után jellemzően milyen nukleotidok szerepelnek, és ezek alapján konszenzus szekvencia született. Géneket célzó egyprimeres, domináns marker. Amplifikáció akkor történik, ha a primer a két szálon egymással szemben beköt, vagyis az ellentétes szálon ugyanabban a régióban a másik leolvasási irányban is gén található. A keletkezett PCR termék egyszerre 2 génről nyújt információt. Felhasználása különösen rezisztencia tulajdonságok meghatározásakor lehet érdekes, ilyenkor az érzékeny és

rezisztens fajták közötti fragmentum különbségek olyan szekvenciakülönbségekre utalhatnak, melyek nagy valószínűséggel valamely biotikus vagy abiotikus stresszel kapcsolatos toleranciáért vagy rezisztenciáért felelős. A primerek 18-20 nukleotidosak, ez biztosítja a jól ismételhetőséget (Rai, 2023).

A marker technikák egymással is kombinálhatók. Erre példa a SAMPL és SASPL technika.

2.3.1.6 SAMPL technika

SAMPL: Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (mikroszatellit polimorf lokuszok szelektív amplifikációja). A PCR során az egyik primert az adaptorra (AFLP), a másikat a mikroszatellit régióra (ISSR) tervezik. Domináns marker (Wotsenboer et al.1997).

2.3.1.7 SASPL technika

SASPL: Selective Amplification of Start codon Polymorphic Loci (startkodon polimorf lokuszok szelektív amplifikációja). A PCR során az egyik primert az adaptor molekulára (AFLP), a másikat start kodonra (SCoT) tervezik. Jól elkülöníthető tulajdonságért felelős gén azonosítására használható domináns marker (Alsamman et al. 2017).

2.3.2 Specifikus primerek

A szekvencia-specifikus primerek alkalmazási területe igen sokrétű lehet a molekuláris biológiában és a genetikai kutatásokban. Például RNS-interferencia során specifikus RNS-fragmentumokat hoznak létre, hogy poszt-transzkripcionálisan elnyomják a gének kifejeződését. Az RNS-fragmentumok előállításához specifikus primereket használnak (Shan, 2010). A szekvencia-specifikus primerek segíthetnek a mutációk azonosításában és elemzésében, mivel ezekkel a primerekkel célozhatók meg a potenciális mutációk helyei a DNS-ben (Bio-Rad Laboratories, Inc, 2024). Az RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism (restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus) az egyik legkorábbi molekuláris marker, amelyet genetikai térképezéshez fejlesztettek ki. A homológ DNS szekvenciák közötti különbséget specifikus restrikciós endonukleázokkal történő emésztés után, a különböző hosszúságú fragmentumok jelenléte alapján állapítják meg. Az RFLP marker specifikus egy klón-restrikciós enzim kombinációra. A jelölt DNS szekvencia Southern blot során hibridizál

egy vagy több fragmentummal a megemésztett DNS mintából. A legtöbb ilyen marker kodomináns és lokusz specifikus. A technika felhasználható például szülő-utód kapcsolatok és öröklött betegségek detektálásában (Thermo Fisher Scientific Inc., 2024; Jarcho, 2001). A legtöbb RFLP marker kodomináns és lokuszspecifikus.

A qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) technikánál a DNS amplifikációját polimeráz láncreakcióval valós időben figyelik, melyhez szekvencia specifikus primerekkel kombinált fluoreszcens jelölőket használnak. Ez a kvantitatív módszer lehetővé teszi a DNS mennyiségének relatív vagy abszolút meghatározását a mintákban (Čepin, 2017).

A specifikus primerek tehát olyan részekre illeszkednek, amelyeket az adott kísérlet során vizsgálni szeretnénk. A primerek tervezése az első fontos lépés a sikeres PCR érdekében, hiszen a specifitás nagyban befolyásolja az amplifikált termékek számát, minőségét. A primertervezés során a legfontosabbak a primer hossza, a primer hosszának különbsége, a GC-tartalom, a primer 3' végének nukleotid-összetétele, az olvadási hőmérséklet (T_m) és az olvadási hőmérséklet-különbség (T_m -diff). Figyelembe kell venni a másodlagos struktúrákat, például dimereket (cross és self dimer) és a hajtú képződést is. Az optimális eredmény érdekében primer tervező szoftverek alkalmazása javasolt, melyből ma már számos változat online, ingyenesen is elérhető (Chuang et al. 2013).

A primer szekvencia degeneráltnak számít, ha bizonyos pozíciókon több lehetséges bázispár is szerepelhet benne. A primer degeneráltsága azt jelenti, hogy hány egyedi szekvenciakombinációt tartalmazhat. Az ilyen primerek tervezése fontos feladat, amikor csak részlegesen ismerünk egy géncsaládot, vagy ha kapcsolódó fajokkal foglalkozunk (Linhart és Shamir, 2005). A degenerált primerekkel végzett PCR specifitását touch-down beállítással növelhetjük. Ha az első két ciklusban a tapadási hőmérsékletet az olvadási hőmérséklet fölé tesszük, úgy nagyon kevés primer fog betapadni, viszont olyan helyekre, ahol tökéletes a komplementaritás. A módszer lényege, hogy az első tíz ciklusban mindig 1°C -kal lejjebb visszük a tapadási hőmérsékletet, ezzel növelve a primerek betapadási arányát és a specifikus amplikonok számát. Az utolsó 24 ciklusban az ún. végső kapcsolódási hőmérsékletet állítjuk be, ahol a primerek még éppen be tudnak kötni. Ezzel szintén a specifikus PCR termékek felerősödését támogatjuk (Wunderlich, 2021).

2.3.3 Kutatásban használt markerek

Kutatásunkban először startkodont célzó primereket használtunk, majd a kajszi genotípusokat a COR génekre tervezett két további primerpárral is analizáltunk.

A következőkben szakirodalmi példákat mutatunk be a SCoT markerek gyakorlati alkalmazásával kapcsolatban.

2.3.3.1 SCoT markerekkel szerzett tapasztalatok és azokkal elért kutatási eredmények

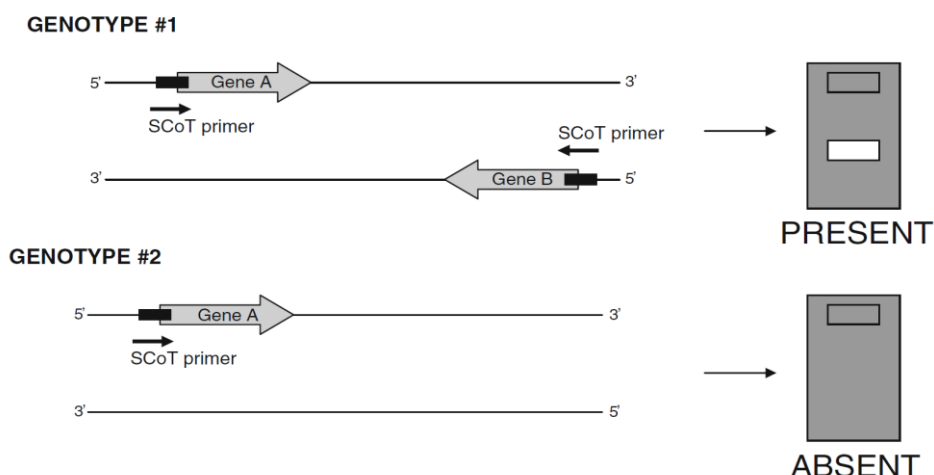
Az SCoT marker a startkodont szegélyező régiót célozza meg, amely a növényi gének erősen konzervált régiója. Ezért képes megkülönböztetni egy adott gén genetikai változatait, amelyek egy adott tulajdonsághoz kapcsolódnak. Ez egy egyszerű, újszerű, költséghatékony, nagymértékben polimorf és reprodukálható molekuláris marker, amelyhez nincs szükség előzetes szekvencia információra. A közelmúltban a SCoT markereket számos kereskedelmi szempontból fontos és alulhasznosított növényfajban alkalmazták, ideértve a genetikai diverzitás elemzését, fajta, hibrid, faj azonosítását, az ivar meghatározását, a kapcsolódási térkép felépítését, szövettényészetben nevelt növények asszociációs térképezését, analízisét, differenciális génexpresszióját és genetikai hűségvizsgálatát (Rai, 2023).

Általánosságban elmondható, hogy az SCoT-markerekkel végzett vizsgálatok reprodukálhatóak, kiértékelésük prezencia-abszencia (0,1) típusú táblázat alapján történik. Collard és Mackill (2008) a kétmintás, különböző napokon és különböző PCR gépeken elvégzett kísérleteknél néhány primerrel nem kaptak reprodukálható profilokat, ami arra utal, hogy a primer hossza (18 nukleotid) és az olvadási hőmérséklet (50°C) önmagában nem biztosítja a reprodukálhatóságot. Ez hangsúlyozza annak szükségességét, hogy gondosan tesztelni kell az összes, e technika alkalmazásával előállított markert a RAPD-hoz hasonlóan, valamint a PCR körülmények további optimalizálására lehet szükség. Megfigyelésük szerint a magasabb GC-tartalommal rendelkező primerek általában jobb reprodukálhatósággal bírtak.

A SCoT markerek használatát rizs genotípusokon validálták (Collard és Mackill, 2008), de használatukkal eredményeket értek el mogoró (Xiong et al. 2011), szőlő (Guo et al. 2012) és burgonya (Gorji et al. 2011) valamint orchidea genotípusok elkülönítésében (Bhattacharyya et al. 2013), és rózsafajták genetikai diverzitásának felmérésében (Agarwal et al. 2019) is.

A SCoT markerek dominánsak, működésüket a következő ábrán szemléltetjük (2. ábra) (Collard és Mackill, 2008).

2. ábra. A SCoT domináns markerek működése.
(Forrás: Collard és Mackill, 2008)



Guo és munkatársai (2012) kutatása szerint a SCoT technika nagyon informatív és nagyon hasznos lehet a szőlő genetikai diverzitásának vizsgálatában. A kezdetben rendelkezésre álló 36 SCoT primer közül elvetették azokat, amelyeknél csak kevés vagy túl sok fragmentumot tapasztaltak, vagy amelyek rosszul reprodukálódtak az ismétlések során. Végeredményben 64 szőlő genotípust analizáltak 17 SCoT markerrel. A PCR-hez Taq polimerázt és 50°C-os tapadási hőmérsékletet használtak. Az amplikonokat 1%-os TBE agaróz gélen választották szét. A markerek nagy arányban voltak polimorfak, ami magas diszkriminációs képességet jelent. A PIC értékek (polimorfizmus információtartalom) magasak voltak (0,75 és 0,91 között mozogtak), a kiértékelt 131 fragmentumból 122 volt polimorf, ami jelzi a SCoT technika nagyon magas megkülönböztető képességét. A tanulmány azt mutatta, hogy a szőlőben a polimorf lokuszok aránya és az átlagos polimorf lokuszok száma magasabb, mint más növényfajoknál. A SCoT markerek nagyon informatívak a szőlő esetében, még a SSR és más markerekkel szemben is. Az eredmények alapján a SCoT markerek hatékonyan alkalmazhatók a szőlők filogenetikai kapcsolatainak tanulmányozására. Az Amerikából és Kínából származó vad *Vitis* fajok ezzel a módszerrel jól elkülöníthetők.

Xiong és munkatársai (2011) tanulmányukban 20 mogyoró genotípust vizsgáltak, és szintén 36 SCoT primerből választották ki azt a 18 primert további elemzésre, amelyek egyértelmű és ismételhető sávmintázatokat mutattak. Ezek eredményeit használták fel a genetikai hasonlósági és csoportosítási elemzésekhez. A 18 primer összesen 157 fragmentumot hozott létre, melyek

közül 97 jelen volt az összes genotípusban, és 60 sáv volt polimorf. A PI érték (polimorfizmus index) 0,09 (SCoT 19) és 1,65 (SCoT 15) között változott, átlagosan 0,82 volt, amely azt mutatja, hogy bizonyos DNS-polimorfizmusok kimutathatók a földimogyoró botanikai változatai között SCoT markerek használatával.

Gorji és munkatársai (2011) kutatásukban három marker technika hatékonyságának összehasonlítását végezték el (SCoT, ISSR, RAPD). Tanulmányukhoz 24 burgonya fajtát használtak és 85 random kiválasztott F1 tetraploid egyedet. Az F1 nemzedékből kiválasztott egyedek mindegyike a 'White Lady' és 'S440' keresztezéséből származott (Keszthely, Burgonyakutatói Központ). A genomi DNS-t *in vitro* módon előállított növények szárából és leveléből Walbot és Warren (1988) eljárása szerint vonták ki. A SCoT marker analízishez 12 primert használtak, melyeket az egyes PCR-ek alkalmával 15 féleképpen random módon összepárosítottak. A 15 primerpár az F1 nemzedék egyedeinél 130 míg a fajták esetén 187 fragmentumot amplifikált. Az F1 egyedeknél átlagosan 8,7 míg a fajtáknál 12,5 polimorf fragmentumot számoltak. Az F1 genotípusok minden primerpárjára vonatkozó polimorfizmus százalékos átlaga 20, míg a fajták esetében ez az érték 61 volt. Az SCoT primerek közül a S04-12, S05-11, S11-16 és S13-14 primerpárok több mint egy allélt mutattak egy adott lokuszon. A kutatás alapján végeredményben a markerek közül a SCoT-ok bizonyultak a leginformatívabbnak, őket követték az ISSR és RAPD technikák.

Bhattacharyya és munkatársai (2013) tanulmányukban hat természetes populációhoz tartozó, hatvan orchidea egyedet vizsgáltak a meglévő genetikai változatosság szempontjából. A 16 SCoT marker összesen 132 fragmentumot amplifikált, amelyek 96,21%-os polimorfizmust mutattak. A PIC érték 0,78 volt. A polimorf lokuszok százalékos aránya (P_p) 25% és 56,82% között mozgott. A génáramlás értéke (0,37) és a populációk közötti diverzitás (0,57). A molekuláris variancia elemzés (AMOVA) 43,37% -os változatosságot mutatott ki a populációkon belül, míg 56,63% változatosságot mutattak ki a populációk között. A csoport analízis szintén magas genetikai változatosságot mutatott ki a genotípusok között. A jelenlegi vizsgálatok azt mutatják, hogy a SCoT technika érzékeny az alacsony szintű genetikai változásokra, így nagyon hasznos eszközt biztosít a populációgenetika széles körű elemzésére, valamint fajok vagy populációk azonosítására. Megállapították, hogy a SCoT markerrendszer hatékony eszköz a *D. nobile* genetikai változatosságának becslésére, és előzetes pontként szolgálhat a jövőbeli kutatásokhoz ezen egészségügyi fontosságú, veszélyeztetett orchidea faj populációs és evolúciós genetikájában.

Agarwal és munkatársai (2019) 29 rózsafajta genetikai diverzitásának felmérésére alkalmazták a SCoT markerrendszert. Kutatásukhoz genomi DNS-t használtak. A 36 SCoT marker közül a legtöbbnél számos polimorf fragmentumot figyeltek meg, melyek 150 és 1200 bp között amplifikálódtak. A primerek közül a SCoT 21 eredményezte a legtöbb sávot, a SCoT 17 és SCoT 22 pedig a legkevesebbet. Négy primer nem eredményezett fragmentumokat (SCoT 7, SCoT 9, SCoT 27, SCoT 32). A markerek hatékonyságát bináris táblázat alapján állapították meg. A PIC értékek 0,42 és 0,92 között alakultak. A prezencia-abszencia táblázat alapján dendrogramot is készítettek, melynek segítségével sikerült feltérképezniük a vizsgált fajták közötti rokonsági kapcsolatokat.

A következő alfejezetben ismertetjük az STS koncepció lényegét, majd a COR47 primerpárok gyakorlati alkalmazására hozunk példákat, emellett az azokkal folytatott kutatások eredményeit ismertetjük.

2.3.3.2 COR47 primerpárok gyakorlati alkalmazása

Az STS koncepciót Olsonnak és munkatársainak (1989) köszönhetjük, akik felismerték, hogy az egyedi DNS szekvenciák markerként szolgálhatnak a gének genetikai és fizikai feltérképezéséhez. Az STS régió néhány száz bp hosszúságú, feltérképezett helyzetű DNS szekvencia.

Az STS régiókra tervezett markerek általában kodomináns öröklődést mutatnak. Ezen DNS szakasz két végén a szekvenciák egyediek, konzerváltak. Ide sorolhatók a mikroszatellitek (SSR, STM, SSRP) de a SCAR, CAPS és ISSR markerek is (National Library of Biotechnology Information, 2024c).

Különböző környezeti hatásokra a növényekben különböző fehérjék expresszálódhatnak megvédve őket az abiotikus stresszhatásoktól. A növények hideg ellenállósága már régóta foglalkoztatja a kutatókat. A COR (Cold-Regulated) gént először *Arabidopsis thaliana*-ban írták le, majd az erre a géncsaládra írt primereket több növényben is kipróbálták. Irena Zalunskaité és munkatársai (2008) kísérletében in vitro körülmények között nevelt szamócán alkalmazták a COR47X1F1 és R1 primereket. A szamócát laboratóriumi körülmények között nevelték és 30 napos hideg hatásnak tették ki. Ezalatt öt alkalommal (a 6., 12., 18., 24. és 30. napon) RNS-t izoláltak, majd reverz transzkriptázzal és COR47X1F1 primer használatával cDNS-t állítottak elő. Ezután a génexpressziót COR47X1R1 primerrel elkészített PCR-rel vizsgálták. A fragmentumokat agaróz gél elektroforézissel választották szét. Két jellegzetes fragmentumot

detektáltak 600 és 250bp magasságban. A vizsgálatot cseresznyével és meggyel is megismételték és a kiértékelésnél a szamócánál kapott eredményeket használták referenciaként. A vizsgálat mindegyik fajnál mutatott polimorfizmust, de a kiértékelésénél azt találták, hogy bár ezek a fragmentumok a vizsgálat alá vont fajok bizonyos egyedeinél megjelentek, azokat mégsem tudták egyértelműen a hidegtűrő fenotípushoz társítani, mert e tekintetben szabályosság nem mutatkozott.

A közelmúltban Hallajian és munkatársai (2023) 28 kajszi genotípust vizsgáltak STS régiókra tervezett primerekkel. A hidegtűrésért felelős gének, azaz COR gének polimorfizmusának kimutatására két specifikus primerpárt használtak.

Az első primerpár (COR47X1R1 és COR47X1F1) hat fragmentumot amplifikált a vizsgált fajtákban. Három mutáns klónban 295 bp magasságban egyedi sávok jelentek meg, melyek a hidegtűréssel hozhatók kapcsolatba.

A második primer (COR47X2R1 és COR47X2F1) több különbséget mutatott a vizsgált genotípusok között. Négy polimorf allélt eredményezett egy toleráns fajtában melyek 250, 350, 620 és 1180 bp hosszúságúak voltak. A 620 és 1180 bp méretű fragmentumok összefügghetnek a hidegtűrési tulajdonságokkal. Ezen kívül ez a primer két egyedi, 395 és 550 bp méretű fragmentumot mutatott az egyik mutáns klónban ('M40-11'), valamint három egyedi sávot 450, 620 és 700 bp magasságban három mutáns klónban ('M50-4', 'M50-6' és 'M50-2'). A vizsgálatok alapján ez utóbbi genotípusokat hidegtűrő fajtaként regisztrálják.

A jobb áttekinthetőség érdekében a Hallajian és munkatársai (2023) szerinti COR47X1 és COR47X2 primerpárokkal amplifikált fragmentumokat táblázatos formában is bemutatjuk **(2. táblázat)**.

2. táblázat. CORX1 és X2 primerpárokkal amplifikált fragmentumok.
(Forrás: saját szerkesztés Hallajian et al. 2023 nyomán)

bp	Hidegtűrés	Általános	Egyedi	Primerpár	Genotípusok
150			X	COR47X1	1 fagyérzékeny fajta
250		X			fagyérzékeny fajták
295	X				3 mutáns klón ('M60-5', 'M60-15', 'M40-11')
350		X			fagyérzékeny fajták egy kivétellel
580			X		2 fagyérzékeny fajta
1150			X		2 fagyérzékeny fajta
350		X		COR47X2	fagytűrő és fagyérzékeny fajták
395			X		'M40-11' mutáns klón
450			X		'M50-4', 'M50-6', 'M50-2' mutáns klónok
550			X		'M40-11' mutáns klón
580			X		2 fagyérzékeny fajta
620	X				'Jahangiri fagytűrő fajta' és 3 mutáns klón ('M50-4', 'M50-6', 'M50-2')
700			X		'M50-4', 'M50-6', 'M50-2'
1150			X		2 fagyérzékeny fajta
1180	X				'Jahangiri' fagytűrő fajta

3 Anyag és módszer

A levélmintákat 2023 tavaszán a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kertészettudományi Intézetének Gyümölcsstermesztési Kutató Központjának Ceglédi Kutatóállomásán telepített ültetvényekből gyűjtöttük. A kísérletben 18 genotípust, ezek között 4 hibridet vizsgáltunk (**1. táblázat**). A vizsgálatokat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet laboratóriumában végeztük el.

3.1 DNS kivonás

A begyűjtött, majd -20°C-on tárolt levelekből NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) protokoll szerint DNS-t izoláltunk. A minták eldörzsölésénél késhegynyi PVP-t (polivinil-pirrolidon) adagoltunk, melyet általában magas polifenol tartalmú növényeknél alkalmazunk, hogy megakadályozza a DNS fenolos vegyületek általi szennyeződését. A dörzsölésnél végig ügyeltünk rá, hogy a mintáink ne olvadjanak ki, ennek érdekében a mozsarat és a botokat előzetesen fagyaszttóban tároltuk. A dörzsölést addig folytattuk míg a mintáink liszthez hasonló állagúvá váltak, eközben azokhoz szükség szerint két-három alkalommal folyékony nitrogént adagoltunk. Az eldörzsölt növényeket alkohollal áttörölt spatulával mintánként külön csőbe előzetesen előkészített 400 µL PL1 lízis pufferbe kapartuk, majd Vortex segítségével összekevertük. Következő lépésben az RNS-ek bontását mintánként 10 µL RNase hozzáadásával biztosítottuk. Az így elkészített elegyet Vortex-szel kevertük össze, majd 30 percig 65°C-on inkubáltuk, ezt követően 5 percig maximális fordulatszámon centrifugáltuk. Az összetört részek átszűréséhez lila Nukleospin filtert alkalmaztunk, melyet előzetesen gyűjtőcsőbe helyeztünk. Miután a felülúszót átmértük a lila csőoszlopba, 2 percig centrifugáltuk (11.000x g).

Ezt követően mintánként egy 1,5 ml kapacitású Eppendorf csövet feliratozunk, abba 450 µL PC puffert mértünk.

A DNS megkötését az alábbiak szerint végeztük el. A zöld csőoszlopot egy új, 2ml térfogatú gyűjtőcsőbe helyeztük, majd a mintákból 650µL-t átmértünk, centrifugáltuk (11.000x g), majd ezt a két lépést megismételtük.

A zöld szilika membránt 3 lépésben mostuk át. Az első mosás alkalmával a csőből kiöntöttük a folyadékot és az oszlopba 400µL PW1 puffert mértünk. A PW1 pufferes mintát 1 percre a centrifugába tettük, majd a folyadékot kiöntöttük a csőből. A második mosást 700µL, a harmadikat 200µL PW2 puffer hozzáadásával tettük meg. A műveletet mindkét esetben az első

mosáshoz hasonlóan centrifugálással fejeztük be. Két mosás között a folyadékot mindig kiöntöttük a csőből. A DNS mosást 2 perces centrifugálással fejeztük be (11.000x g), melynek alkalmával a csövet üresen (puffer adagolása nélkül) tettük a készülékbe. Amikor az etanol elpárolgott a mintáinkból, a DNS kivonást a leoldás lépésével folytattuk.

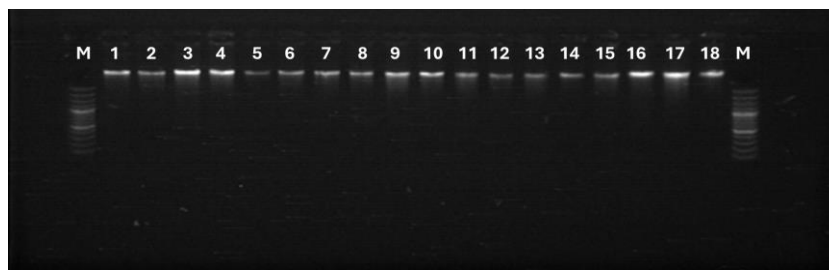
A leoldó puffert előzetesen 65°C-ra előmelegítettük. A zöld csőoszlopot új Ependorf csőbe helyeztük és az oszlop közepére célozva 50µL PE puffert mértünk rá. A mintáinkat 65°C-on 5 percre inkubátorba helyeztük majd egy percig centrifugáltuk (11.000x g). Újabb 50 µL PE puffer hozzáadása után az utolsó két lépést megismételtük. A csőoszlopról leoldott DNS-t tartalmazó folyadékot a következő felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.2 DNS minták minőségellenőrzése

A növényekből kivont DNS mennyisége és minősége kihatással van a későbbi vizsgálatok kimenetelére, így annak ellenőrzésére még a kutatás első fázisában szükség van.

A minőség ellenőrzéséhez 1%-os TBE agaróz gélt készítettünk (Lonza, SeaKem LE Agarose), abba 5 µL etídium-bromidot kevertünk. Parafilmre előzetesen mintánként 1 µL loading dye-t mértünk. A mintákat pipettával új hegygel felkevertük, 5 µL-t a loading dye-hoz adagoltunk, ezután a zsebekbe töltöttük. Az utolsó zsebbe 2µL Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp PLUS DNS létrát tettünk. A kivont DNS intakt maradt, várakozásainknak megfelelően mintánként egy éles fragmentumot kaptunk (**3. ábra**). A zsebek jelölésénél a fajtanevek helyett az 1. táblázatban közölt számot, „Ssz.” használjuk.

3. ábra. DNS minőség-ellenőrzés 1%-os 0,5X TBE agaróz gélen, mintasorrend 1-18., minták jelölése az 1. számú táblázat alapján. M: Gene Ruler 100bp plus DNS létra.
(Forrás: saját munka)



A DNS koncentrációt Nanodrop spektrométerrel (Thermo Scientific NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) ellenőriztük. A NanoDrop 1000 3.8.1 program elindítása után az érzékelőt steril vízzel tisztítottuk majd a DNS leoldáshoz használt PE pufferrel kalibráltuk. A mérés előtt

a mintákat pipettával összekevertük. A vizsgálathoz az egyes mintákból 2 µL mennyiséget használtunk. Két minta felvitele között az érzékelőt száraz papírtörlővel tisztítottuk.

3.3 PCR

A mintáinkat kétféle markerrendszerrel analizáltuk. Első körben tizenhárom SCoT markert alkalmaztunk, hogy meghatározzuk a kutatásba vont kajszi fajták polimorfizmusát, majd COR47 STS régióra tervezett primerpárokat használtunk a hidegtűréssel kapcsolatba hozható DNS szakaszok kimutatására. A PCR paraméterek beállításánál mindkét markertípus esetén szakirodalmi adatokra támaszkodtunk. Vizsgálatainknál kétféle polimerázt - GoTaqG2 (Promega Corporation) és Phusion (Thermo Fischer Scientific) - használtunk.

3.3.1 PCR SCoT markerekkel

A molekuláris genetikai vizsgálatba Collard és Mackill (2008) publikációja alapján, az általuk kifejlesztett SCoT markerek közül 13-at vontunk be (**3. táblázat**). A primereket konszenzus szekvenciákból tervezték, úgy, hogy az ATG kodont +1, +2 és +3, a „G”-t a +4 pozícióban, és „A, C”-t és „C”-t a +7, +8 és +9 pozícióban rögzítették. Minden primer 18 bázis hosszúságú és a GC-tartalom tartomány 50% és 72% között mozog. A guanin és citozin közötti három hidrogénkötésnek köszönhetően a primer erősebben tud kötődni, ugyanakkor a magas GC tartalom magasabb olvadási hőmérsékletéhez (T_m) vezet. A dimer és hajtűképződési hajlamosságot előzetesen „FAST PCR” programmal ellenőrizték.

3. táblázat. Vizsgálatba vont SCoT markerek szekvenciája, olvadási hőmérséklete és GC tartalma.
(Forrás: saját szerkesztés Collard & Mackill, 2008 nyomán)

Primer jelölés	szekvencia	T _m	GC%
SCoT 1	5' -CAA CAA TGG CTA CCA CCA-3'	52,6°C	50
SCoT 3	5' -CAA CAA TGG CTA CCA CCG-3'	53,9°C	56
SCoT 12	5' -ACG ACA TGG CGA CCA ACG-3'	58,4°C	61
SCoT 13	5' -ACG ACA TGG CGA CCA TCG-3'	58,0°C	61
SCoT 15	5' -ACG ACA TGG CGA CCG CGA-3'	62,6°C	67
SCoT 18	5' -ACC ATG GCT ACC ACC GCC-3'	60,7°C	67
SCoT 19	5' -ACC ATG GCT ACC ACC GGC-3'	60,7°C	67
SCoT 22	5' -AAC CAT GGC TAC CAC CAC-3'	55,0°C	56
SCoT 29	5' -CCA TGG CTA CCA CCG GCC-3'	61,7°C	72
SCoT 30	5' -CCA TGG CTA CCA CCG GCG-3'	61,8°C	72
SCoT 31	5' -CCA TGG CTA CCA CCG CCT-3'	60,4°C	67
SCoT 33	5' -CCA TGG CTA CCA CCG CAG-3'	58,9°C	67
SCoT 34	5' -ACC ATG GCT ACC ACC GCA-3'	59,7°C	61

A SCoT markereket először 3 mintán teszteltük, majd amikor azok működéséről megbizonyosodtunk, a PCR-t az összes mintánkon elvégeztük. A PCR reakcióhoz GoTaq G2 (Promega Corporation) DNS polimerázt használtunk. A master mixet gyártói protokoll (Promega Corporation) alapján állítottuk össze. A pontos mennyiségeket egy mintára a **4. táblázat** tartalmazza.

4. táblázat. PCR master mix összetétele egy mintára, GoTaq G2 DNS polimeráz és SCoT primer alkalmazása esetén.
(Forrás: saját munka)

Sorszám	Komponens	Mennyiség [μl]
1.	Steril víz	4,45
2.	5X GoTaq Reaction Buffer	2
3.	2mM dNTP	1
4.	Primer	1,5
5.	GoTaq G2 DNS Polimeráz	0,05
6.	DNS templát	1
Végtérfogat:		10

A reakcióhoz Bioer - GeneExplorer Thermal Cyclor készüléket használtunk.

A PCR paramétereit Collard és Mackill (2008) publikációja nyomán állítottuk be. Ez alapján az elő-denaturálás 94°C-on 2 percig zajlik. A denaturálás 94°C-on fél percig tart. Ezt követi a primer tapadás, melynek optimális hőmérséklete a primer olvadási hőmérséklete alatt 5°C-kal található (50°C). A ciklus harmadik fázisa a lánchosszabbítás. A 2 perces 72°C-os lánchosszabbítási szakasz alatt a GoTaq G2 DNS polimeráz maximum 2 kb hosszúságú DNS szakaszt másol le. Az utó-lánchosszabbítás 5 percig tart (72°C). A ciklus 35-ször ismétlődik. A PCR termékeket a készülékből való kivételéig 16°C-on tartottuk (**5. táblázat**).

5. táblázat. PCR protokoll SCoT marker és GoTaqG2 DNS polimeráz kombinációjához.
(Forrás: Saját munka)

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Elő-denaturálás	Denaturálás	Primer tapadás	Lánc-hosszabbítás	Utó-lánchossz.	Áztatás
94°C	94°C	50°C	72°C	72°C	16°C
2:00	0:30	01:00	2:00	5:00	∞
	35X				

3.3.2 PCR COR47 primerpárokkal

Vizsgálatainkat a COR géncsaládra tervezett COR47X1 és COR47X2 primerpárokkal folytattuk. A primerpárok szekvenciáit a következő táblázat tartalmazza (6. táblázat).

6. táblázat. STS régiókra tervezett (COR47) primerpárok szekvenciái.
(Forrás: saját szerkesztés Hallaijan et al. 2023 nyomán)

Primer jelölés	Szekvencia
COR47X1F1	5' -ACRTTCCCGAGCACGAGACH-3'
COR47X1R1	5' -CTCCAARATACCCTTCTTYTCC-3'
COR47X2F1	5' -ACRTTCCCGAGCACGAGACH-3'
COR47X2R1	5' -CCAWRATHCCCTTCTTYTCKYSG-3'

3.3.2.1 PCR GoTaq G2 polimerázzal

A PCR reakcióhoz először GoTaq G2 (Promega Corporation) DNS polimerázt használtunk. A master mixet gyártói protokoll (Promega Corporation, 2024) alapján állítottuk össze

(7. táblázat).

7. táblázat. Gyártói javaslat a GoTaq G2 DNS polimeráz sztenderd alkalmazásához 1 mintára, a master mix összetételének és az összetevők arányainak meghatározásához.
(Forrás: saját szerkesztés Promega Corporation, 2024 nyomán)

Komponens	Végtérfogat [μl]	Végkoncentráció
5X Zöld vagy színtelen	10	1X (1,5mM MgCl ₂)
PCR Nukleotid mix, 10mM	1	0,2mM dNTP
Forward primer	X	0,1-1 μM
Reverz primer	Y	0,1-1 μM
GoTaq G2 DNS polimeráz	0,25	1,25u
DNS templát	Z	<0,5μg/50μl
Nukleáz mentes víz	50	mikroliterig

A PCR paramétereket („PCR protokoll 1”) Hallajian és munkatársai (2023) nyomán állítottuk be, de a denaturálási hőmérsékletet és időt, valamint a primer kitapadási és lánc-hosszabbítási időt a polimeráz sajátosságaihoz igazítottuk **(8. táblázat)**. A reakcióhoz Bioer - GeneExplorer Thermal Cyclor készüléket használtunk.

8. táblázat. „PCR protokoll 1” GoTaq G2 polimerázzal és COR47 primerpárokkal.
(Forrás: saját munka Hallajian et al.2023 nyomán)

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Elő-denaturálás	Denaturálás	Primer tapadás	Lánc-hosszabbítás	Utó-lánc-hossz.	Áztatás
95°C	95°C	63°C	72°C	72°C	16°C
3:00	1:00	01:00	1:30	6:00	∞
	35X				

A reakciót a specifitás növelése miatt Hallajian és munkatársai (2023) publikációjában feltüntetett beállításokon túl, touch-down („PCR protokoll 2”) módszerrel is elvégeztük **(9. táblázat)**.

9. táblázat. „PCR Protokoll 2” (touch-down beállítás) GoTaq G2 polimeráz és COR47 primerek használatával.
(Forrás: saját munka)

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.
Elő-denat.	Denat.	Primer tap.	Lánc-hossz.	Denat.	Primer tap.	Lánc-hossz.	Utó-lánc-hossz.	Áztatás
95°C	95°C	65°C (-1°C/cikl.)	72°C	95°C	56°C	72°C	72°C	16°C
3:00	0:30	0:30	1:15	0:30	0:30	1:15	5:00	∞
	10X			24X				

3.3.2.2 PCR Phusion polimerázzal

A reakciót nagy pontosságú Phusion (Thermo Fischer Scientific) polimerázzal is megismételtük, és ezúttal is Bioer - GeneExplorer Thermal Cyclor készüléket használtunk.

A master mixet 1 mintára az alábbi táblázat szerint mértük össze **(10. táblázat)**.

10. táblázat. Master mix 1 mintára Phusion polimeráz és COR47 primerek használatával.
(Forrás: saját munka)

Sorszám	Komponens	Mennyiség [μl]
1.	Steril víz	6,8
2.	GC Buffer	4
3.	2mM dNTP	2
4.	Primer F	1,5
5.	Primer R	1,5
6.	Phusion DNS Polimeráz	0,2
7.	DNS templát	4
Végtérfogat:		20

A PCR paramétereit („PCR protokoll 3”) először Hallajian és munkatársai (2023) publikációja alapján állítottuk be. Az elődenaturálás 98°C-on 3 percig zajlik. A ciklus 35-ször ismétlődik. A denaturálás 98°C-on tíz másodpercig zajlik (2.lépés). Ezt követi a primertapadás, melynek optimális hőmérséklete a primer olvadási hőmérséklete alatt 5°C-kal található, ez esetünkben 63°C-ot jelent. A 4. lépés a lánc-hosszabbítás, mely 72°C-on 45 másodpercig tart, végül az utó-lánc-hosszabbítás következik, mely 6 perces (72°C). A PCR termékeket a készülékből való kivételéig 16°C-on tartottuk (**11. táblázat**).

11. táblázat. „PCR protokoll 3” Phusion polimerázzal és specifikus COR47 primerpárokkal.
(Forrás: saját munka Hallajian et al. 2023 nyomán)

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
Elő-denaturálás	Denaturálás	Primer tapadás	Lánc-hosszabbítás	Utó-lánc-hossz.	Áztatás
98°C	98°C	63°C	72°C	72°C	16°C
3:00	0:10	00:30	0:45	6:00	∞
	35X				

A PCR-t touch-down beállításokkal („PCR protokoll 4”) is megismételtük, melynek pontos paramétereit az **12. táblázat** tartalmazza.

12. táblázat. „PCR protokoll 4” (touch-down beállítás) Phusion polimerázzal és specifikus COR47 primerpárokkal
(Forrás: saját munka)

I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.
Elő-denaturálás	Dena-turálás	Primer tapadás	Lánc-hosszabbítás	Dena-turálás	Primer tapadás	Lánc-hosszabbítás	Utó-lánc-hossz.	Áztatás
98°C	98°C	65°C (-1°C/cikl.)	72°C	98°C	56°C	72°C	72°C	16°C
3:00	0:10	0:15	0:30	0:10	0:15	0:30	5:00	∞
	10X			24X				

3.4 Agaróz gélelektroforézis

Az amplitikonok szétválasztására minden esetben agaróz gélelektroforézist használtunk.

A SCoT primerekkel készült PCR termékek méret szerinti szétválasztására 2%-os 0,5X TBE pufferes agaróz gél (Lonza Bioscience, SeaKem LE Agarose) használtunk.

A COR 47 primerekkel és Phusion polimerázzal készült termékeket 2%-os 0,5X TBE pufferes agaróz gélen (Lonza Bioscience, SeaKem LE Agarose), míg a GoTaq polimerázzal készült PCR termékeket 3,5%-os 1X TBE pufferes MetaPhor agaróz (Lonza Bioscience, MetaPhor Agarose) gélen választottuk szét. A fragmentumokat etídium-bromid hozzáadásával tettük láthatóvá.

3.5 Kiértékelés

Az első és utolsó zsebbe minden esetben 2 μ L Thermo Scientific Gene Ruler 100bp PLUS DNS létrát pipettáztunk. A kiértékelést prezencia-abszencia táblázattal végeztük el. Az értékelés során csak a jól megkülönböztethető, megismételhető fragmentumokat vettük figyelembe. A markerek hatékonysági mutatóinak megállapításához iMEC online kalkulátort használtunk (Amiryousefi et al. 2018). Végül a bináris táblázatok alapján dendrogramot készítettünk IBM SPSS Statistics 23 szoftver használatával. Az alkalmazás funkciói közül a hierarchical cluster analízist használtuk a Within-groups bináris alapú variáciát nézve.

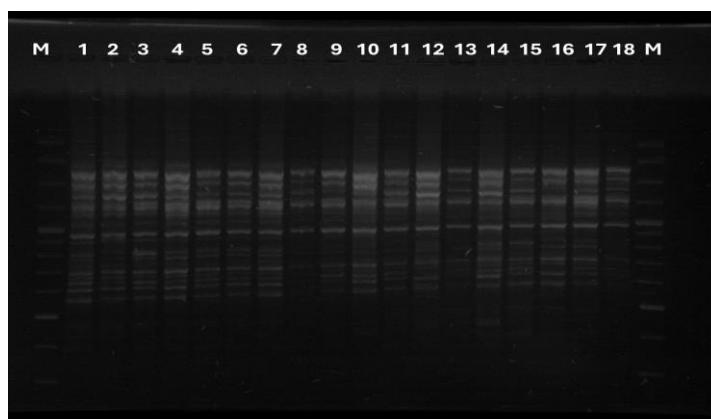
4 Eredmények

A NucleoSpin Plant II Maxi kittel (Macherey-Nagel) a kajsziбарack leveléből kivont genomi DNS minden vizsgált genotípus esetén megfelelő mennyiségű és minőségű volt, így kísérleteink során végig azokkal dolgoztunk. A következő alfejezetekben vizsgálati eredményeinket ismertetjük.

4.1 SCoT marker analízis

A következőkben a SCoT markerekkel készült agaróz gélelektroforézis eredményeinek ismertetésével folytatjuk. Összességében megállapítható, hogy a tizenhárom marker közül tizenkettő különböző mértékű polimorfizmust mutatott, míg egy - a SCoT 22 - monomorf mintázatot adott (**4. ábra**).

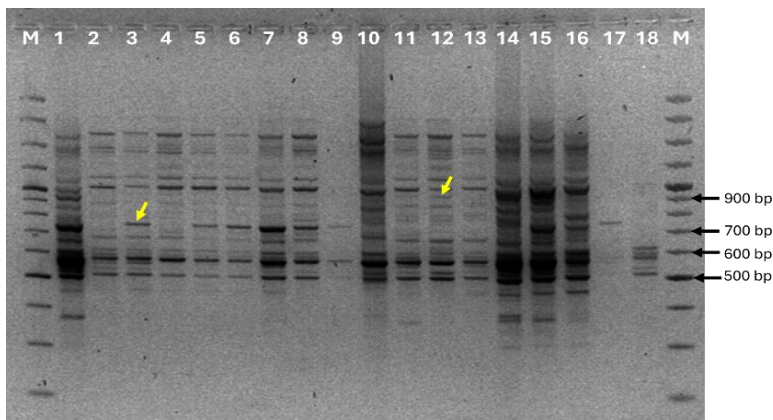
4. ábra. A SCoT 22 marker monomorf mintázatot mutat az 1-18. számú minták esetén. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp plus.
(Forrás: saját munka)



A következőkben azok közül a gélfotók közül, melyek a polimorfizmus szempontjából szignifikánsabb eredményt hoztak, többet is részletesen bemutatunk.

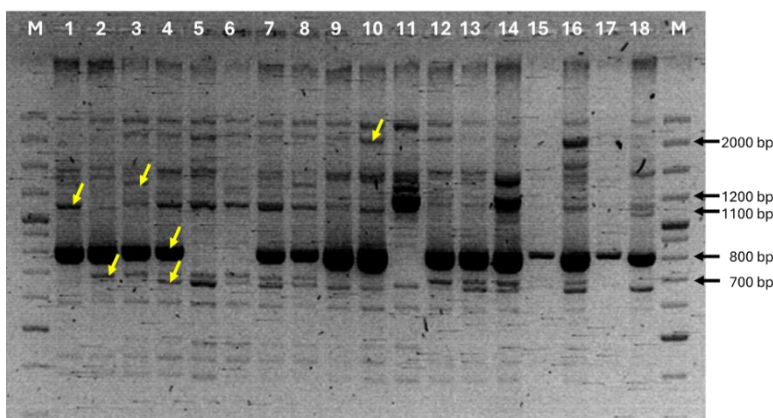
Az **5. ábrán** látható, hogy a SCoT 1 jelű marker ~750bp magasságban az 1., 3., 5., 6., 7., 8., 9., 15., 16., 17. minták esetén, valamint 900bp magasságban az 1., 12., 14., 15. mintáknál polimorf fragmentumot amplifikált.

5. ábra. A SCoT 1 marker 2 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. számú minták esetén. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp plus. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



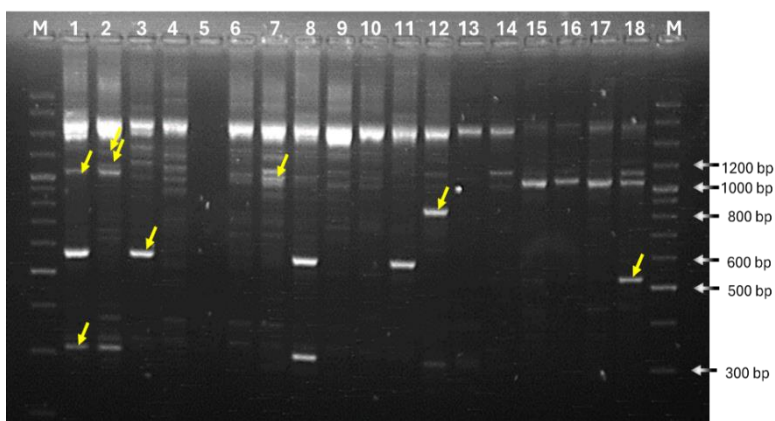
A SCoT 3 markerrel ~670 és 2000bp között hat polimorf sávot kaptunk (**6. ábra**). 2000bp magasságban az 1., 2., 11., 15., 17., 18. minta kivételével minden esetben látható fragmentum, míg ~1250bp-nál csak öt minta esetén látunk különbséget (1., 3., 9., 12., 16.). A 2., 15., 17. mintáknál ~1150bp magasságban nem képződött sáv, míg 800bp magasságban az 5., 6., 11. minták a kivételek. A legkisebb polimorf fragmentum nagyjából 670bp-nál található, mely a minták kétharmadánál megfigyelhető (kivételek: 1., 2., 3., 12., 15., 17.).

6. ábra. A SCoT 3 marker 6 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. számú minták esetén. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp Plus. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



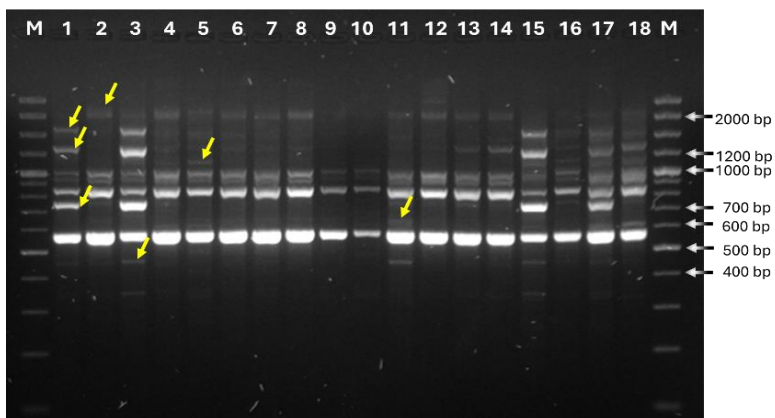
A SCoT 12 marker nyolc polimorf fragmentumot mutatott ~1180, ~1100, ~1070, 1000, 800, ~570, ~530 és ~310bp magasságban (**7. ábra**). Három minta (1., 2., 9.) esetén látunk különbséget ~1180bp-nál, és 1100bp-nál öt minta (2., 3., 6., 7., 9.) esetén amplifikálódott fragmentum. Egyedi sáv látható 800bp magasságban a 12. számú minta esetén, valamint ~530bp magasságban a 18. minta esetén.

7. ábra. A SCoT 12 marker 8 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. számú minták esetén. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp plus. Egyedi fragmentum látható 800bp (12) és 530 bp (18) magasságban. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



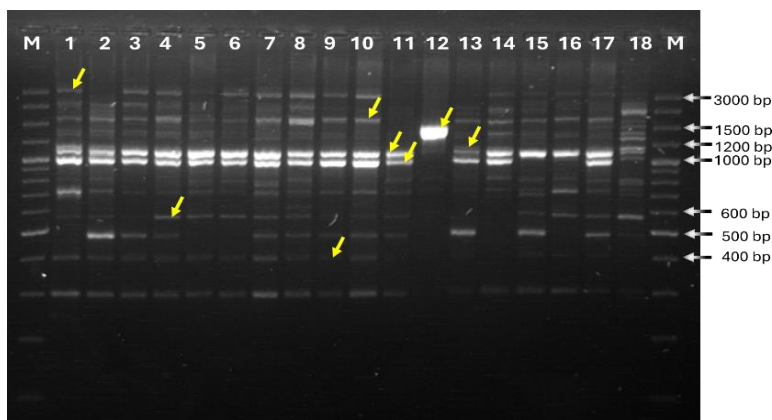
A SCoT 15 markerrel (**8. ábra**) hét polimorf sávot kaptunk: ~470bp magasságban a 3., 11., 15. mintáknál, 600bp magasságban a 11., 17., 18. számúaknál, 700bp magasságban az 1., 3., 15., 17. minták esetén, és ~1050bp-nál az 5., 15., 17., 18. fajtáknál figyelhető meg fragmentum. További különbségek láthatók néhány genotípus esetén ~1100bp-nál az 1., 3., 13., 14., 15., 17., 18. számúaknál, 1200bp-nál az 1., 3., 15., 16., 17., 18. mintáknál és 1500bp magasságban mindegyik fajtánál, öt mintát (1., 9., 10., 15., 16) kivéve.

8. ábra. A SCoT 15 marker 7 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. számú minták esetén. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp plus. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



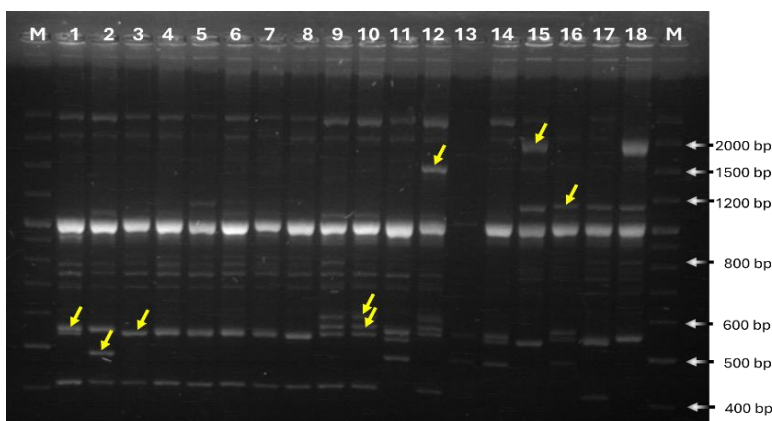
A SCoT 33 markerrel (**9. ábra**) nyolc polimorf fragmentumot kaptunk, melyek 3000, 1500, ~1250, ~1110, ~1100, 1000, ~550, 400bp magasságban jelentek meg. Érdekeség, hogy a 12. számú minta esetén csak egyetlen fragmentum jelent meg ~1250bp magasságban, mely a többi mintánál nem található meg.

9. ábra. A SCoT 33 marker 8 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. számú minták esetén. M: Gene Ruler 100bp plus. A 12. minta esetén egyedi sáv látható ~1250bp magasságban. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



A következő ábrán (**10. ábra**) a SCoT 34 markerrel készült PCR eredménye látható. Nyolc polimorf szakasz amplifikálódott, a legkisebb ~480bp magasságban, a legnagyobb 2000bp-nál. A 9, 10, 12. számú mintáknál 600 és ~550 bp magasságban látható különbségtételre alkalmas fragmentum.

10. ábra. A SCoT 34 marker 8 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp plus. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



A gélképek bináris kiértékelése után meghatároztuk a markerek polimorfizmus információtartalmát iMEC kalkulátor használatával (Amiryousefi et al. 2018). A szoftver beállításai szerint domináns markerek esetén a várt heterozigotizás (H) és a polimorfizmus információtartalom (PIC) maximális értéke bináris adatok esetén 0,5, mivel lokuszonként két allélt feltételez, és mindkettőt befolyásolja az allélok száma és gyakorisága. A kodomináns markerek esetében ezek az értékek 0 és 1 között változnak. A magas értékek mindkét markerrendszer fejlett diszkriminációs képességét jelzik. Látható, hogy a legnagyobb PIC értéket a vizsgált minták függvényében a SCoT 12 marker adta (PIC 0,42). A SCoT 22 marker monomorf mintázata miatt binárisan nem került kiértékelésre (**13.táblázat**).

13. táblázat. Alkalmazott SCoT markerek polimorfizmus indexei. Értékelés: iMEC kalkulátorral. H: Várt heterozigotizás; PIC: Polimorfizmus információtartalom; E: Effektív multiplex arány; MI: Marker index.
(Forrás: saját munka)

MARKER	H	PIC	E	MI
SCoT 1	0,44	0,35	1,00	0,44
SCoT 3	0,44	0,35	2,67	0,01
SCoT 12	0,48	0,42	1,00	0,48
SCoT 13	0,48	0,37	1,00	0,48
SCoT 15	0,46	0,35	8,33	0,02
SCoT 18	0,48	0,36	6,67	0,02
SCoT 19	0,49	0,37	6,56	0,01
SCoT 22	0,00	0,00	0,00	0,00
SCoT 29	0,49	0,37	4,56	0,02
SCoT 30	0,50	0,39	1,00	0,50
SCoT 31	0,32	0,27	11,17	0,01
SCoT 33	0,41	0,33	10,67	0,02
SCoT 34	0,50	0,38	1,00	0,50

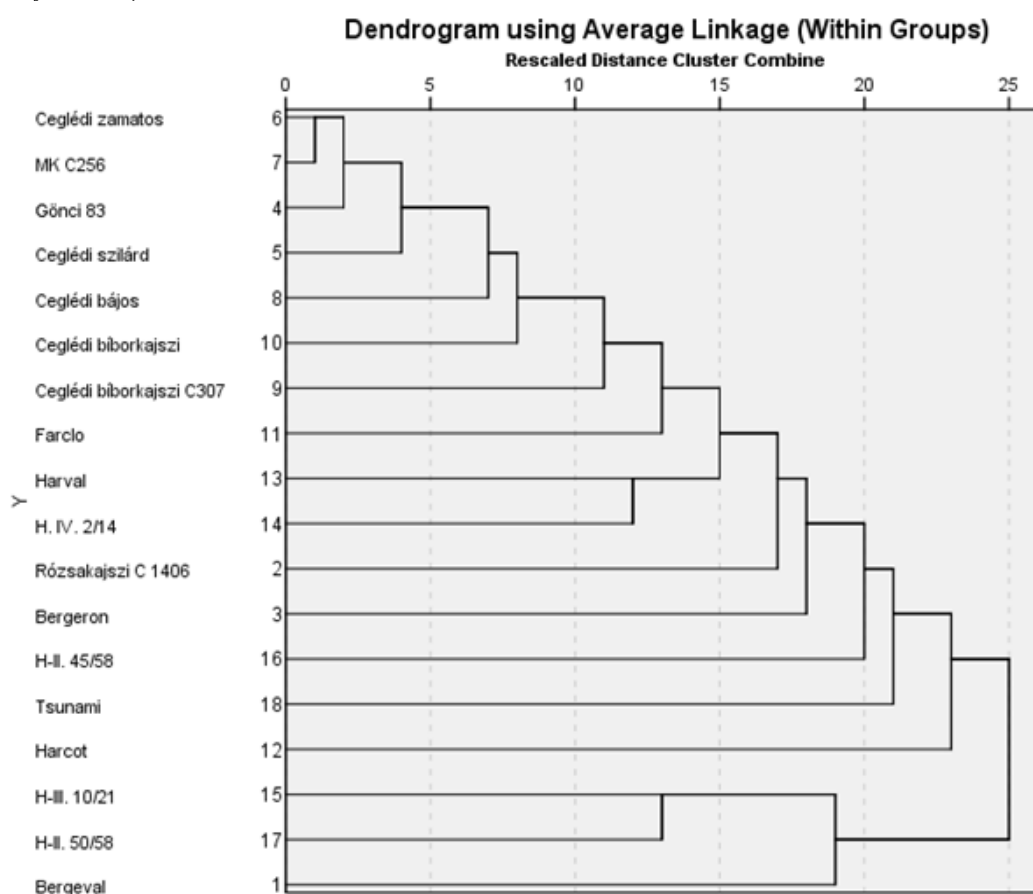


Magas

Alacsony

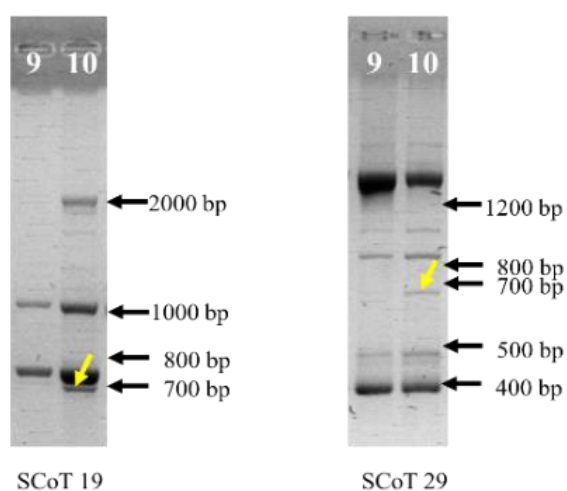
A bináris táblázat alapján dendrogramot is készítettünk (**11. ábra**). Ez alapján két nagyobb klasztert tudtunk elkülöníteni. Az első klasztert a 'Bergeval' és további két hibrid alkotja, a másik klaszter több kisebb csoportban tartalmazza a többi fajtát. Az eredményekből látható, hogy a 'Ceglédi zamatos' és a 'Magyar Kajszi C.256' klónt nem tudtuk egyértelműen elkülöníteni a vizsgálatba vont markerek segítségével.

11. ábra. Klaszter analízis 1-18. számú minták. Készült: IBM SPSS Statistics 23 szoftver használatával.
(Forrás: saját munka)



A klónok elkülönítése molekuláris markerekkel nem egyszerű feladat, de mi mégis találtunk polimorf fragmentumokat, mellyel a 'Ceglédi bíborkajszi'-t (10. sz. minta) és annak 307. számú klónját (9. sz. minta) meg tudtuk egymástól különböztetni. A SCoT 19 és SCoT 29 markerek által mutatott különbségételre alkalmas szakaszokat a következő ábrán mutatjuk be. Érdekesség, hogy az említett fragmentumok mindkét marker esetén 700bp magasságban találhatók (12. ábra).

12. ábra. 'Ceglédi bíborkajszi' (10) és 307 sz. klónjának (9) megkülönböztetésére alkalmas SCoT 19 és SCoT 29 markerek által amplifikált fragmentumok 700bp magasságban. Fragmentumok szétválasztása 2% 0,5X TBE agaróz gélen.
(Forrás: saját munka)



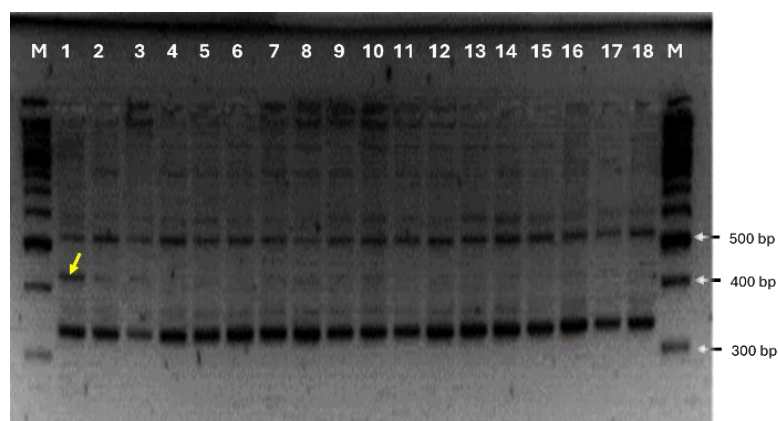
4.2 Analízis COR47 primerpárokkal

Mint ahogy azt a 3.3.2 fejezetben ismertettük, a COR47 primerpárokkal kétféle polimerázzal és kétféle protokoll szerint hajtottunk végre PCR-t.

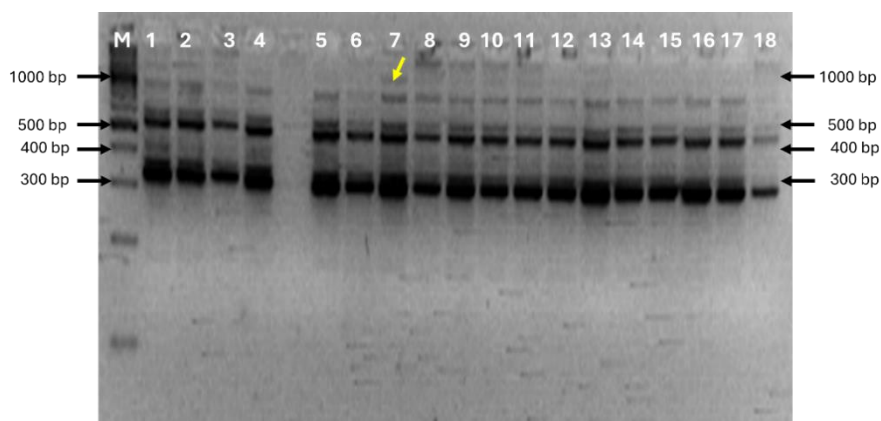
Először a GoTaq G2 polimerázzal készült eredményeket ismertetjük.

A COR47 primerek és GoTaqG2 polimeráz kombinációja a Hallajian és munkatársai (2023) publikációjában feltüntetett protokoll szerint X1 és X2 esetén is csak egy-egy polimorf fragmentumot adott, melyeket csak egy-egy minta esetén láthatunk. A CORX1 esetén (**13. ábra**) az 1. számú mintánál, ~420bp magasságban, valamint CORX2 primernél (**14. ábra**) az 1., 2. és 7. mintánál ~1180bp magasságban. Mindkét primer általános fragmentumot produkált ~320bp-nál.

13. ábra. PCR COR47X1primerpár és GoTaq polimeráz kombinációjával szakirodalmi adatokon alapuló protokoll szerint. A marker 1 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. M: Gene Ruler 100bp plus. Fragmentumok szétválasztása 3,5%-os 1X TBE MetaPhor agaróz gélen. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)

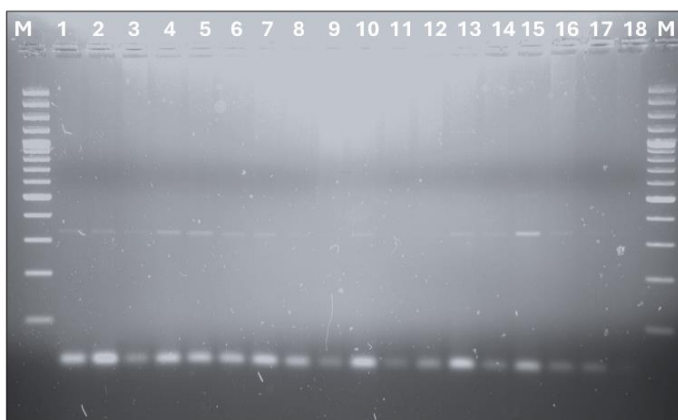


14. ábra. PCR COR47X2 primerpár és GoTaq polimeráz kombinációjával szakirodalmi adatokon alapuló protokoll szerint. A marker 1 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. M: Gene Ruler 100bp plus. Fragmentumok szétválasztása 3,5%-os 1X TBE MetaPhor agaróz gélen. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



A COR47X1 primerpárral és touch-down protokollal készült gélfotó csak a korábbiakban is tapasztalt ~320bp magasságban lévő általános sávot mutatta (**15. ábra**).

15. ábra. PCR COR47X1 primerpár és GoTaq polimeráz kombinációjával touch-down protokoll szerint. A marker általános fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén 300-400bp között. Fragmentumok szétválasztása 3,5%-os 1X TBE MetaPhor agaróz gélen. M: Gene Ruler 100bp plus.
(Forrás: saját munka)



A CORX2 primerpár esetén ugyanezekkel a paraméterekkel készült PCR eredményén két, minden mintánál jelenlévő sávot tapasztaltunk, az egyik ~320bp-nál, a másik 500bp-nál van. Egyedi fragmentum látható a 13. számú mintánál ~1180bp magasságban. További szakaszok 900bp magasságban a 2., 6., 10., valamint ~620bp magasságban a 13. mintánál (**16. ábra**).

16. ábra. PCR COR47X2 primerpár és GoTaq polimeráz kombinációjával touch-down protokoll szerint. A marker 3 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. M: Gene Ruler 100 bp plus. Fragmentumok szétválasztása 3,5%-os 1X TBE MetaPhor agaróz gélen. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



A COR47 X1 és X2 primerpárokkal elvégzett PCR-ek eredményeit a könnyebb áttekinthetőség kedvéért táblázatos formában is összeszedtük. A következő táblázat **(14. táblázat)** a GoTaq G2 polimerázzal amplifikált fragmentumokat összesíti. Hallajian és munkatársai (2023) által megfigyelt, hidegtűréssel összefüggésbe hozható fragmentumokat tartalmazó sorokat szürke kijelöléssel tettük hangsúlyosabbá.

14. táblázat. COR47X1 és COR47X2 primerpárokkal amplifikált fragmentumok GoTaq G2 polimerázzal. A hidegtűréssel összefüggésbe hozható fragmentumokat szürke sáv jelöli.

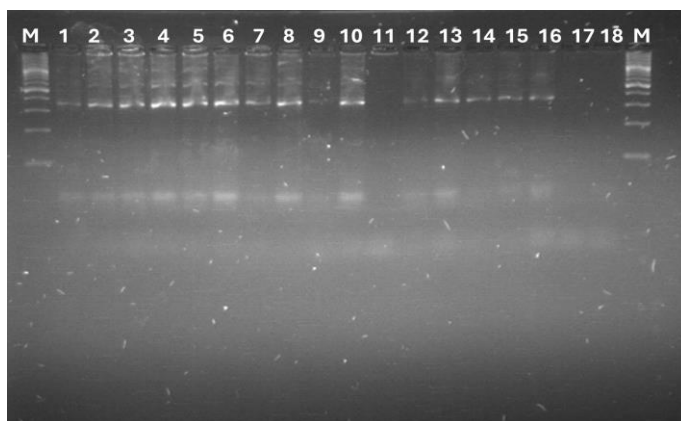
(Forrás: saját munka)

bp	Hidegtűrés	Általános	Egyedi	Primerpár	*PCR protokoll	Genotípusok
320		X		COR47X1	1	Minta 1-18.
420			X			'Bergeval'
500		X				Minta 1-18.
320		X		Minta 1-18.		
500		X		Minta 1-18.		
1180	X					'Magyar Kajszi C. 256'
320		X		COR47X1	2	Minta 1-18.
320		X		COR47X2		Minta 1-18.
500		X				Minta 1-18.
620	X					'Harval'
900			X			'Rózsakajszi C. 1406', 'Ceglédi zamatos', 'Ceglédi bíborkajszi'
1180	X					'Harval'

*PCR protokoll 1: Hallajian et al. (2023) , 2: Touch-down beállítás

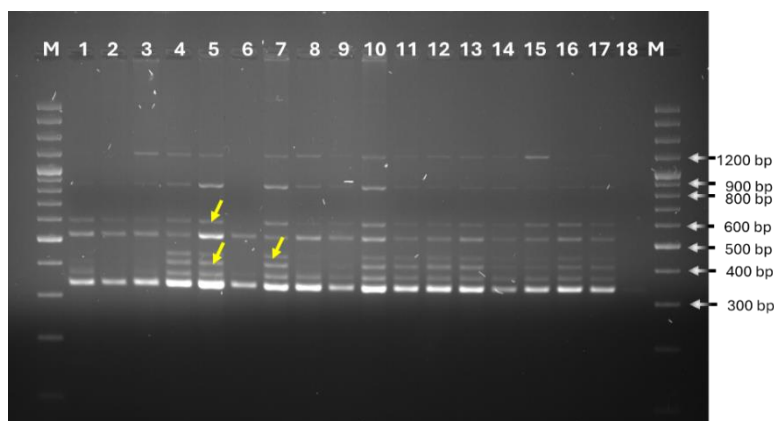
A következőkben röviden ismertetjük azon PCR-ek eredményeit, amelyek szintén a COR47 primerpárokkal de Phusion polimerázzal készültek, és a protokollt Hallajian és munkatársai (2023) publikációja alapján állítottuk be. A COR47X1 primerpárral készült gélfotó ez esetben minőségileg kifogásolható lett, de jól látszik a korábbiakból ismert ~320bp magasságban lévő általános fragmentum. A képen polimorfizmus nem látható (**17. ábra**).

17. ábra. PCR COR47X1 primerpár és Phusion polimeráz kombinációjával szakirodalmi adatokon alapuló protokoll szerint. A marker állandó fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén 300 és 400bp között. M: Gene Ruler 100 bp plus. Fragmentumok szétválasztása 2%-os 0,5X TBE agaróz gélen.
(Forrás: saját munka)



Az azonos protokoll szerint COR47X2 primerekkel készült PCR esetén is csak három polimorf fragmentumot találtunk (**18. ábra**). Ezek 600, ~450 és 400bp magasságban találhatók. A 2., 3., 6. és 18. minták a 400 és 450 bp fragmentumokat nem tartalmazzák.

18. ábra. PCR COR47X2 primerpár és Phusion polimeráz kombinációjával szakirodalmi adatokon alapuló protokoll szerint. A marker 3 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. M: Gene Ruler 100 bp plus. Fragmentumok szétválasztása 2%-os 0,5X TBE agaróz gélen. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



A következő táblázat (**15. táblázat**) azon Phusion polimerázzal amplifikált fragmentumokat összesíti, ahol a PCR protokollt Hallajian et al. (2023) szerint állítottuk be. A hidegtűréssel összefüggésbe hozható szakaszokat nem találtunk.

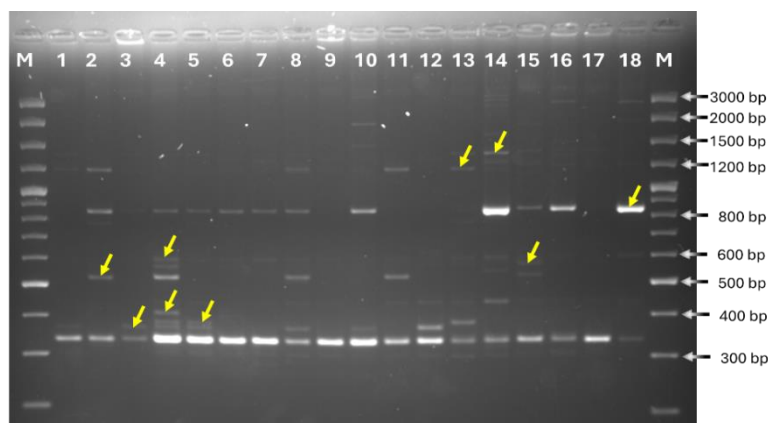
15. táblázat. COR47X1 és X2 primerpárokkal amplifikált fragmentumok Phusion polimerázzal, PCR protokoll Hallajian et al. (2023) publikációja szerint.
(Forrás: saját munka)

bp	Hidegtűrés	Általános	Egyedi	Primerpár	*PCR protokoll	Genotípusok
320		X		COR47X1	3	Minta 1-18.
320		X		COR47X2		Minta 1-18.
390		X				Minta 1-18.
400		X				Minta 1-18. kivéve: 'Rózsakajsz C. 1406', 'Bergeron', 'Ceglédi zamatos', 'Tsunami'
450		X				Minta 1-18. kivéve: 'Rózsakajsz C. 1406', 'Bergeron', 'Ceglédi zamatos', 'Tsunami'
600		X				Minta 1-18. kivéve: 'Ceglédi zamatos'
900		X				Minta 1-18.
1200		X				Minta 1-18.

*PCR potokoll 3: Hallajian et al. (2023)

COR47X1 primerpár esetén - Phusion polimeráz és touch-down protokoll kombinációjával - 9 polimorf fragmentumot találtunk. A legkisebb ~370, a legnagyobb ~1300bp környékén tűnt fel. Általános fragmentum látható ~320bp-nál. Egyedi fragmentum látható 1300bp magasságban a 13. és 14. számú minta esetén. A 4. és 15. mintáknál ~550bp magasságban láthatunk polimorf szakaszokat, ~1180bp -nál öt hidegtűrő genotípus mutat egyedi fragmentumot. A 4. számú minta esetén egyedi fragmentum is látható 400bp magasságban (**19. ábra**).

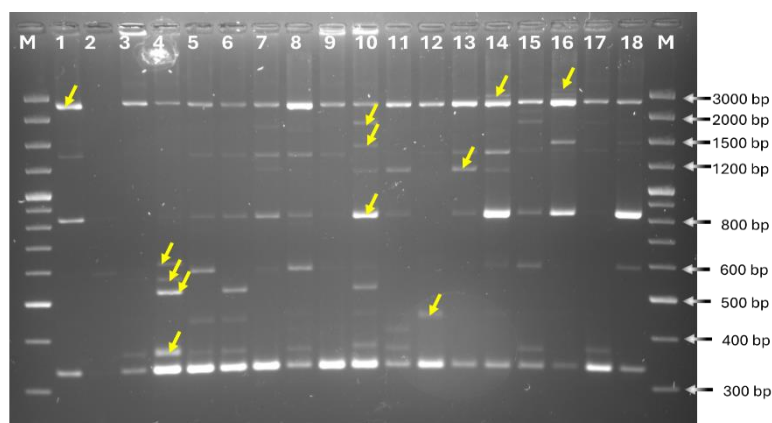
19. ábra. PCR COR47X1 primerpár és Phusion polimeráz kombinációjával, touch-down protokoll szerint. A marker 9 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. M: Gene Ruler 100bp plus. Fragmentumok szétválasztása 2%-os 0,5X TBE agaróz gélen. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.
(Forrás: saját munka)



Az előzőhöz nagyon hasonló képet mutat a COR47X2 primerpárral, Phusion polimerázzal és touch-down beállításokkal készített PCR eredménye. Itt tizenkét polimorf fragmentumot jelöltünk. Az első szembetűnő különbség, hogy a COR47X1 primerekhez képest nagyobb fragmentumok is képződtek. 2900 bp magasságban a 2. minta kivételével állandó szakasz tapasztalható, és 1180 bp-nál öt esetben (7., 10., 15., 17., 18. minták) amplifikálódott PCR termék. A ~320bp magasságában lévő sáv ugyanúgy jelen van az összes mintánál, mint az előző esetben. A 4. minta esetén ~570bp magasságban egyedi fragmentumot láthatunk, míg az ~550bp-nál lévő sávok további két mintában (6., 10.) is jelen vannak. További polimorfizmusok láthatók ~840, ~450 és ~360bp magasságban. Két hibridnél (14., 16.) 3000bp-nál egyedi fragmentum található, ezek közül az egyik (16.) 3100bp-nál is különbözőséget mutat (**20. ábra**).

20. ábra. PCR COR47X2 primerpár és Phusion polimeráz kombinációjával, touch-down protokoll szerint. A marker 12 polimorf fragmentumot amplifikált az 1-18. minták esetén. M: Gene Ruler 100bp plus. Fragmentumok szétválasztása 2%-os 0,5X TBE agaróz gélen. A polimorfizmusokat sárga nyilak jelölik.

(Forrás: saját munka)



Az eredmények azt mutatták, hogy protokolltól függetlenül, azoknál a PCR-eknél, ahol Phusion polimerázt használtunk, egyértelműen több fragmentum jelent meg a gélképen mint GoTaq G2 polimeráz használatával. Polimorfizmus szempontjából a Phusion polimerázzal készült, touch-down protokoll szerint végrehajtott PCR-ek hozták a legjobb eredményt.

A következő táblázat **(16. táblázat)** azon Phusion polimerázzal amplifikált fragmentumokat összesíti, melyet touch-down PCR beállításokkal hoztunk létre. A hidegtűréssel összefüggésbe hozható szakaszokat szürke sáv jelöli.

16. táblázat. COR47X1 és X2 primerpárokkal amplifikált fragmentumok Phusion polimerázzal. A hidegtűréssel összefüggésbe hozható fragmentumokat szürke sáv jelöli.

(Forrás: saját munka)

bp	Hidegtűrés	Általános	Egyedi	Primerpár	*PCR protokoll	Genotípusok
320		X		COR47X1	4	Minta 1-18.
370		X				fagyűrő és fagyérzékeny genotípusokban
380			X			'Gönci 83', 'Ceglédi szilárd', 'Harval'
400			X			'Gönci 83'
500			X			'Rózsakajsi', 'Gönci 83', 'Ceglédi bájos', 'Farcló', 'H-III. 10/21'
550			X			'Gönci 83', 'H-III. 10/21'
600		X				5 fagyűrő fajta kivételével az összes mintában
820		X				fagyűrő és fagyérzékeny fajtáknál ('Ceglédi bíborkajsziban' igen, de klónjában nincs jelen)
1180	X					'Bergeval', 'Rózsakajsi C. 1506', 'Ceglédi bájos', 'Farcló', 'Harval', 'H-IV. 2/14'
1300			X			'Harval', 'H-IV. 2/14'
320		X		COR47X2		Minta 1-18.
350		X				fagyűrő és fagyérzékeny genotípusokban
450			X			fagyűrő és fagyérzékeny genotípusokban
550			X			'Gönci 83', 'Ceglédi zamatos', 'Ceglédi bíborkajsi'
570			X			'Gönci 83'
620	X					'Gönci 83'
840		X				fagyűrő és fagyérzékeny genotípusokban
1180			X			'Magyar Kajsi C. 256', 'Ceglédi bíborkajsi', 'Farcló', 'Harval', 'H-IV. 2/14'
1500			X			'Ceglédi bíborkajsi', 'H-II. 45/58', 'Tsunami'
2000			X			'Magyar Kajsi C.256', 'Ceglédi bíborkajsi', 'H-III. 10/21'
2900		X				'Rózsakajsi C. 1406' kivételével minden mintában
3000			X			'H-IV. 2/14', 'H-II. 45/58'
3100			X			'H-II. 45/58'

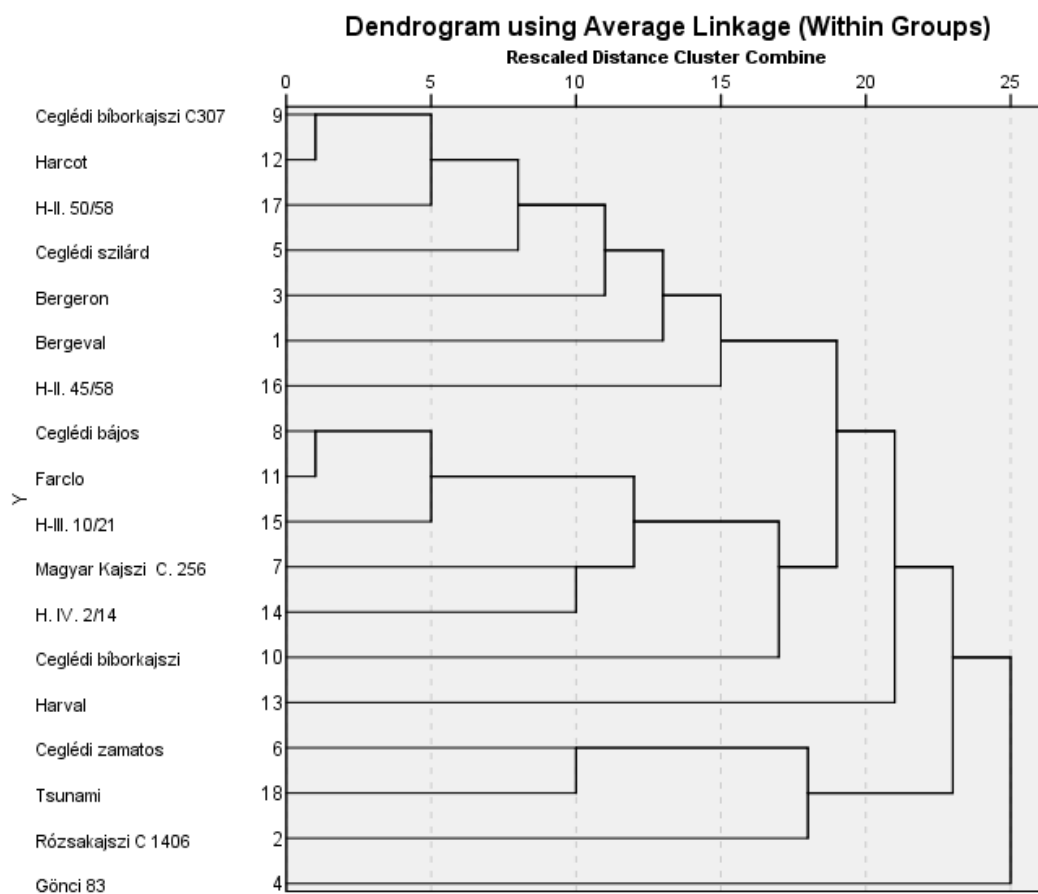
*PCR protokoll 4: Touch-down beállítás

A COR47X1 és X2 primerpárokkal készült géleképeket binárisan kiértékeltek és dendrogramot készítettünk. A klaszter analízis a fajták hidegtűrésére utaló szabályosságot nem mutat

(21. ábra).

21. ábra. Klaszter analízis 1-18. számú minták, a COR47 primerpárok bináris értékelése alapján. Készült: IBM SPSS Statistics 23 szoftver használatával.

(Forrás: saját munka)

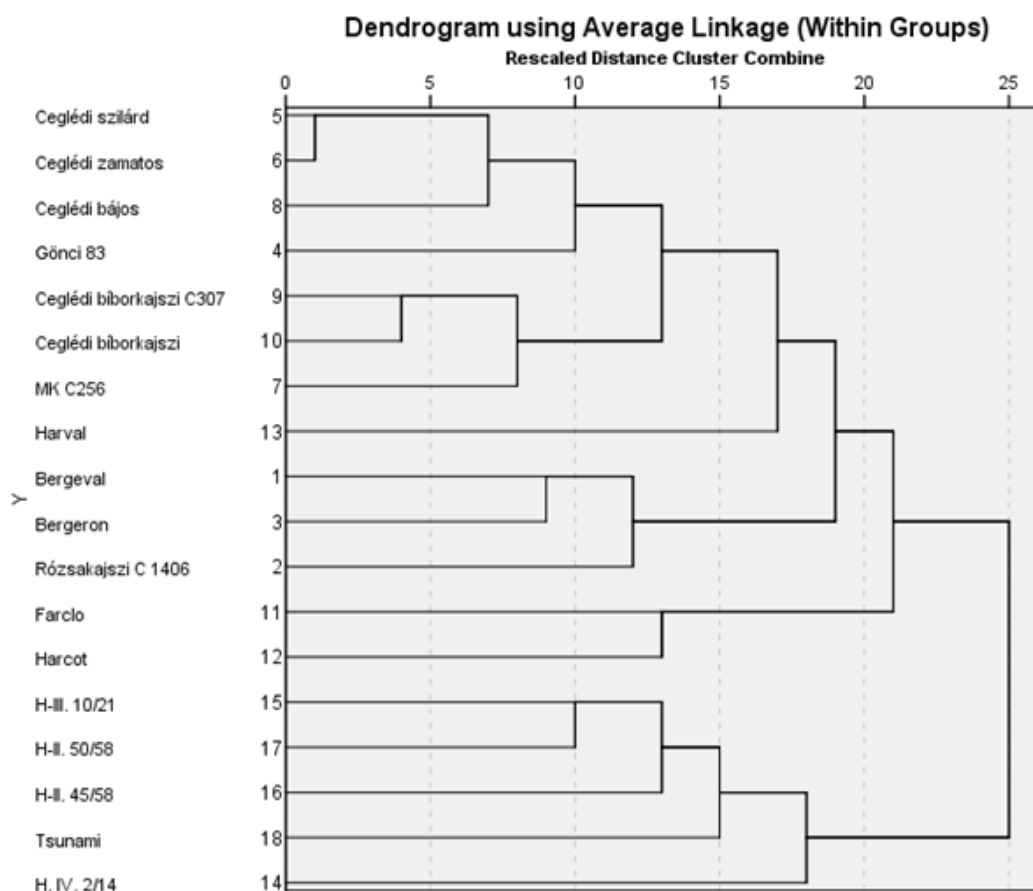


A SCoT markerek és a „PCR Protokoll 4” (touch-down beállítás) szerint COR47 primerpárokkal készült bináris táblázatok összesítése alapján dendrogramot készítettünk. Két nagyobb klasztert figyeltünk meg. Az elsőben az általunk vizsgált négy hibrid (14., 15., 16., 17. sz. minták) és a 'Tsunami' (14. sz.) található. Ezek a genotípusok jó és közepes hidegtűrési tulajdonságokkal rendelkeznek.

A másik klasztert további négy nagyobb csoportra tudtuk bontani. Külön egységet alkot a 'Farclo' és a 'Harcot' (1. csoport), a 'Bergeval' a 'Bergeron' és a 'Rózsakajsi C. 1406' (2. csoport), a 'Harval' egymaga (3. csoport), végül a ceglédi és magyar fajták (4. csoport). Utóbbin belül a 'Ceglédi bíborkajsi' (9) és klónja (10) a 'Magyar kajsi C. 256' (7) fajtával alkot egy kisebb egységet, de a két fagyérzékeny genotípus elkülönül (**22. ábra**).

22. ábra. Klaszter analízis 1-18. számú minták, a SCoT markerek és COR47 primerpárok együttes bináris kiértékelése alapján. Készült: IBM SPSS Statistics 23 szoftver használatával.

(Forrás: saját munka)



5 Következtetések és javaslatok

Kutatásunkban két különböző markertechnikával analizáltunk 18 kajszi genotípust. A 4. fejezetben ismertetett eredményeinket szakirodalmi adatokkal vetettük össze.

5.1 SCoT markerek használata

A Collard és Mackill (2008) által kifejlesztett startkodont célzó markereket számos különböző növénycsaládba tartozó növényfaj esetén alkalmaztak már sikeresen az egyes genotípusok elkülönítésére. Az általunk tanulmányozott szakirodalmakban burgonya, szőlő, rizs,ogyoró, orchidea és rózsa fajták megkülönböztetésére használták. Sárgabarack fajtáknál történő alkalmazásról nem találtunk adatot.

A PCR körülményei növényfajtól függetlenül az általunk alkalmazottakhoz hasonlóan alakultak. Genomi DNS-t, Taq polimerázt és 50°C-os primer kapcsolódási hőmérsékletet használtak. Az amplikonok elválasztása 1-2%-os 0,5x TBE agaróz gélen történt.

A felhasznált irodalmak szerint a marker hatékonysága magas, a PIC értékek 0,42 és 0,92 között alakultak. Ez a két szélsőérték a rózsa fajták analízise során jelent meg, ahol a rendelkezésre álló 36 primer közül 32-vel tudtak polimorfizmust kimutatni. A többi növényfaj esetén 12-17 primerrel dolgoztak. Esetünkben a polimorfizmus információtartalom (a SCoT 22-t leszámítva) 0,27 (SCoT 31) és 0,42 (SCoT 12) között változott, ugyanakkor ez az eredmény nem hasonlítható egy az egyben a korábban említett adatokhoz, hiszen az általunk használt szoftverrel a domináns markerek esetén a PIC érték maximuma 0,5 volt.

A SCoT markerek hatékonyságát alátámasztja, hogy BC populációból származó rizs egyedeken validálták, és szőlőfajtákban történő alkalmazás esetén az SSR technikát felülmúlták. A SCoT markerrendszer egyprimeres technika, burgonyánál történő alkalmazásánál a kiválasztott primereket random módon összepárosítva használták. Végeredményben az analizált fajtákat és a kutatásba vont tetraploid genotípusokat (F1 hasadó generáció egyedei) ezzel a módszerrel sikeresen meg tudták különböztetni.

A gélfotók kiértékelésekor nyert bináris adataink alapján elkészített dendrogram azt mutatja, hogy a kutatásba vont 13 markerekkel az analizált genotípusok közül a 'Ceglédi zamatos' és 'Magyar Kajszi C. 256' fajtákat nem tudtuk egyértelműen megkülönböztetni, viszont sikeresen alkalmaztuk a SCoT 19 és SCoT 29 markereket a 'Ceglédi bíborkajszi' és annak 307. számú klónjának elkülönítésére.

Az alkalmazott markerek a várakozásainknak megfelelően jól ismételhető fragmentumokat adtak. Következő lépésként érdemes lenne a PCR-t megismételni azokkal a markerekkel melyek egyedi fragmentumokat amplifikáltak, majd a gélből a fragmentumokat kivágva visszatisztítani és szekvenáltatni.

5.2 COR47 primerpárok használata

A kutatásba vont kajszi genotípusokat ezután egy STS régióra tervezett markerrendszerrel analizáltuk, mely a COR géneket célozza, vagyis azokat a géneket, melyek a hideg által kiváltott abiotikus stresszre expresszálódnak.

Zalunksaité és munkatársai (2008) más fajokban (cseresznye, szamóca, meggy) is tesztelték ezeket a primereket. Első lépésben *in vitro* módon nevelt szamócából izoláltak RNS-t, majd reverz transzkriptázzal cDNS-t állítottak elő. A génexpressziót COR47X1 primerrel mutatták ki kontrollált körülmények között, így az elektroforézis alkalmával 600 és 250bp-nál figyeltek meg fragmentumokat. Kutatásuk eredményeként megállapításra került, hogy a fragmentumok és a hidegtűrési tulajdonságok között nincsen összefüggés.

Hallajian és munkatársai (2023) fagyűrő kajszi fajták megkülönböztetésére használták a COR47X1 és X2 primerpárokat. Mindkét primerpárral kimutattak hidegtűrésért felelős fragmentumokat, és kutatásukra alapozva 3 mutáns klónt regisztrálnak fagyűrő fajtaként. Ennek alapján egyértelműen arra számítottunk, hogy a PCR-ek eredményeként hidegtűréssel összefüggésbe hozható fragmentumokat találunk.

Az általunk vizsgált 18 fajta közül kettő igen gyengén fagyűrő ('Ceglédi bíborkajszi' és 307. számú klónja), három genotípus ('Ceglédi szilárd', 'H.II. 50/58', 'Tsunami') közepesen fagyűrő, a többi jó és nagyon jó hidegtűrési kategóriába sorolható.

Hallajian és munkatársai (2023) nem említene a COR47X1 primerekkel 400 és 500bp között keletkezett fragmentumot, ennek ellenére az általunk kapott eredmények között egy esetben (GoTaq G2 polimeráz és a publikációban látható protokoll kombinációjával) a 'Bergeval' fajtánál ebben a magasságban egyedi sáv mutatkozott.

Érdekesség, hogy egyetlen alkalommal, Phusion polimeráz és COR47X1 primerek használatával touch-down PCR protokollal a 'Ceglédi bíborkajszi' esetén két erős egyedi fragmentumot kaptunk 300 és 500bp között, amiről akkor úgy gondoltuk, hogy a fagyérzékenységhez köthető, ám azokat később nem sikerült reprodukálni.

A Hallajian és munkatársai (2023) kutatása szerint COR47X1 primerpár esetén 295bp, COR47X2 primerpár esetén 620 és 1180bp magasságban vártunk fragmentumokat az általunk

vizsgált hidegtűrő fajták esetén. Meglepetésünkre egy esetben sem tapasztaltunk 300bp alatti sávokat, a legkisebb szakasz 300 és 400bp között általánosan jelentkezett és az összes esetben, minden genotípusnál megfigyelhető volt. COR47X2 esetén a 'Harval' nagyon jó hidegtűrővel rendelkező fajtánál láttunk (az említett publikációban foglaltakhoz hasonlóan) egy esetben 600bp környékén fragmentumot, amikor a PCR-t GoTaq G2 polimerázzal touch-down protokoll szerint végeztük el. Ugyanez a primerpár GoTaq G2 polimerázzal Hallajian et al. (2023) protokollja szerint három hidegtűrő fajtánál amplifikált 1180bp körüli fragmentumot. Esetünkben a COR47X2 helyett, az X1 primerpárok amplifikáltak Phusion polimeráz és touch-down protokoll kombinációjával 1180bp körüli fragmentumokat hat hidegtűrő genotípusban ('Bergeval', 'Rózsakajszai C. 1406', 'Ceglédi bájos', 'Farclo', 'Harval', H-IV. '2-14') melyek fagyérzékeny típusoknál nem jelentkeztek.

A COR47 primerpárok gélfotóit binárisan kiértékeltek, és az összesítésből dendrogramot készítettünk. A klaszter analízis a hidegtűrővel összefüggésbe hozható szabályosságot nem mutatott.

Ezután, a kutatásban résztvevő markereket (SCoT és COR47) együttesen vizsgáltuk. Az összes SCoT markerből nyert bináris adatot, valamint a COR47X1 és X2 „PCR protokoll 4” szerint készült gélképek kiértékelését egy közös dendrogramon jelenítettük meg. A két nagy klaszter közül az egyikben a hibridek, a másikban a többi genotípus található, kisebb csoportokra tagolódva. Ezek közül a 'Harval' egy különálló csoportot alkot, és a két fagyérzékeny fajta ('Ceglédi bíborkajszai' és klónja) elkülönül a többi ceglédi genotípustól.

Hallajian és munkatársai (2023) három, a hidegtűrővel összefüggésbe hozható fragmentumot találtak a COR47 primerpárokkal 295, 620 és 1180bp magasságban. Ahhoz, hogy biztonsággal ki tudjuk jelteni, hogy az általunk ~620 és ~1180bp-nál megfigyelt DNS szakaszok a hidegtűrővel összefüggésbe hozhatóak, a PCR-eket megismételtük, a negatív kontrollt további fagyérzékeny fajták bevonásával erősítjük meg. Célszerű továbbá a 'Harval' fajtánál COR47X1 primerpár és „PCR protokoll 4” kombinációval 1300 bp-nál megfigyelt egyedi fragmentumot külön megvizsgálni.

További lépésként a szakirodalmi adatok alapján hidegtűrővel összefüggésbe hozható, valamint egyedi amplikonokat az agaróz gélből visszatisztítjuk és szekvenáljuk.

6 Összefoglalás

A sárgabarackot széles körben, világszerte termesztik, és a piacon már számos változat elérhető. Sajnos a hazánkban tapasztalható éghajlati körülmények között olyan termesztési nehézségekkel kell számolnunk, melytől a tőlünk délebbre jellemző mediterrán klímán a gazdáknak kevésbé kell tartaniuk. A virágzáskori tavaszi fagyok még a leggondosabb fagyvédelmi intézkedések ellenére is a termést sokszor megritkítják. A fagyok okozta termés kiesést a globális felmelegedés okozta klímaváltozás erősítheti, hiszen a korábban bekövetkező hőmérséklet-emelkedés korábbi virágzást eredményezhet. Ettől azonban az ilyenkor szokásos fagyokkal még ugyanúgy számolnunk kell. Az éghajlatkutatók szélsőséges időjárási viszonyokra is figyelmeztetnek, melyek az agroökoszisztéma megváltozását okozhatják és ez a növények stressztűrő képességét igencsak próbára teheti. A megoldást az abiotikus és biotikus stresszekkel szembeni jobb tolerancia kialakítása, rezisztencia nemesítés jelentheti.

Tekintettel a sárgabarack hosszú fejlődési időszakára, a hagyományos nemesítési módszerek időigényesek (több év is lehet), azonban marker asszisztált szelekcióval (MAS) ez felgyorsítható, pontosabban az időtartam töredékére csökkenthető. A molekuláris markerek már a növény fejlődésének korai szakaszában, a DNS-minták elemzésével lehetővé teszik a nemesítők számára a nemesítési programban kívánt tulajdonságok kiválasztását. A molekuláris markerek segítségével a fajtamegőrzés szempontjából kulcsfontosságú DNS ujjlenyomatot is készíthetünk.

Kutatásunkban kétféle markertechnikát alkalmazva különböztettünk meg 18 sárgabarack fajtát, emellett a hidegtűrőssel kapcsolatba hozható DNS szakaszokat kerestünk.

Az eredményeink alapján látszik, hogy az általunk kiválasztott SCoT markerek magas polimorfizmus információtartalommal bírnak, és alkalmasak kajszi genotípusok megkülönböztetésére. Esetünkben a SCoT 12 adta a legnagyobb PIC értéket (0,42). A SCoT 19 és SCoT 29 primerekkel sikeresen elkülönítettük a 'Ceglédi bíborkajszit' annak 307. jelű klónjától.

A COR génre tervezett primerpárokkal néhány esetben mutattunk ki olyan fragmentumokat, amelyet Hallajian és munkatársai (2023) a hidegtűréssel hoztak kapcsolatba. A COR47X2 primerpár GoTaq G2 polimeráz használatával két különböző protokollal amplifikált fragmentumot a 'Magyar Kajszi C. 256' (1180bp) és 'Harval' (620 és 1180bp) fajtáknál. A Phusion polimerázzal, touch-down beállításokkal elvégzett PCR eredményeként a 'Gönci 83' fajtánál tapasztaltunk 620bp magasságban fragmentumot a COR47X2 primerekkel. A COR47X1 ugyanilyen körülmények között 1180bp-nál amplifikált fragmentumot hat hidegtűró fajtánál, melyet Hallajian és munkatársai a COR47X2 primerekkel tapasztaltak. Esetünkben is előfordult, hogy a CORX2 primerpár 1180bp magasságban amplifikált, de ez a fragmentum a 'Ceglédi bíborkajszi' kifejezetten fagyérzékeny fajtánál is megjelent.

Összességében elmondható az általunk kapott eredmények alapján, hogy mindkét COR47 primerpár alkalmas lehet a fajták közötti különbségtételre. A gélelektroforézis azt mutatta, hogy a Phusion polimeráz touch-down PCR protokollal párosítva adta a legpolimorfabb képet COR47X1 és COR47X2 esetén is. A vizsgált genotípusok közül hét hidegtűró fajtánál tapasztaltunk a Hallajian és munkatársai (2023) által is megfigyelt hidegtűréssel összefüggésbe hozható fragmentumokat, valamint néhány esetben egyedi amplikonok is előfordultak. Ahhoz azonban, hogy biztosan állíthassuk, hogy az általunk is megfigyelt fragmentumok a hidegtűró fenotípusokat jellemzik, további vizsgálatokra, szekvenálásra van szükség.

7 Irodalomjegyzék

- Agarwal, A. - Gupta, V. - Ul Haq, S. - Jatav, P. - Kothari, S. - Kochhwaha, S. (2019). Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasms using SCoT marker. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 780-788. DOI: [10.1016/j.jksus.2018.04.022](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.022)
- Alsamman, M. - Adawy, S. - Shafik, D. - Hussein, B. - Hussein, E. (2017). Selective Amplification of Start codon Polymorphic Loci (SASPL): a new PCR-based molecular marker in olive. *Plant Omics Journal*, 10, 64-77. DOI: [10.21475/POJ.10.02.17.PNE385](https://doi.org/10.21475/POJ.10.02.17.PNE385)
- Amiryyousefi, A. - Hyvönen, J. - Poczai, P. (2018). iMEC: Online Marker Efficiency Calculator. *Applications in Plant Sciences*, 6(6), 4p. DOI: [10.1002/aps3.1159](https://doi.org/10.1002/aps3.1159)
- Bhattacharyya, P. - Kumaria, S. - Kumar, S. - Tandon, P. (2013). Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. *Gene*, 529(1), 21-6. DOI: [10.1016/j.gene.2013.07.096](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.096)
- Bio-Rad Laboratories Inc. (2024). *Mutational Analysis*. Letöltés dátuma: 2024. 04. 03. Forrás: <https://www.bio-rad.com/en-hu/applications-technologies/mutational-analysis?ID=LUSNMLPT>
- CEP Innovation.(2024). *Bergeval Aviclo p.v.r.* CEP Innovation honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 04. 03. Forrás: <https://cepinnovation-novadi.com/variety/bergeval-aviclo/?lang=en>
- Čepin, U. (2017). How Does qPCR Work? (Technology Basics). Letöltés dátuma: 2024. 04. 03. Forrás: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-technology-basics/>
- Chesnokov, Y. - Kosolapov, V. - Savchenko, I. (2020). Morphological Genetic Markers in Plants. *Russ J Genet.*, 56, 1406–1415. DOI: [10.1134/S1022795420120042](https://doi.org/10.1134/S1022795420120042)
- Chuang, L. - Cheng, Y. - Yang, C. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett.*, 1541-9. DOI: [10.1007/s10529-013-1249-8](https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8)
- Chwialkowska, K. - Korotko, U. - Kosinska, J. - Szarejko, I. - Kwasniewski, M. (2017). Methylation Sensitive Amplification Polymorphism Sequencing (MSAP-Seq)—A Method for High-Throughput Analysis of Differentially Methylated CCGG Sites in Plants with Large Genomes. *Front Plant Sci.*, 8(2056). DOI: [10.3389/fpls.2017.02056](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02056)
- Collard, B. - Mackill, D. (2008). Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 86–93. DOI: [10.1007/s11105-008-0060-5](https://doi.org/10.1007/s11105-008-0060-5)
- Gemmil, C., & Grierson, E. (2021). Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR), Microsatellite-Primed Genomic Profiling Using Universal Primers. *Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology*, 2222, DOI: [10.1007/978-1-0716-0997-2_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_14)
- Gorji, A. – Poczai, P. - Polgar, Z. - Taller, J. (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *Am. J. Pot Res.*, 88, 226–237. DOI: [10.1007/s12230-011-9187-2](https://doi.org/10.1007/s12230-011-9187-2)

- Guo, D. - Zhang, J. - Liu, C. (2012). Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses. *Mol Biol Rep*, 39, 5307–5313. DOI: [10.1007/s11033-011-1329-6](https://doi.org/10.1007/s11033-011-1329-6)
- Hallajian, M. - Pakdel, M. - Bouzari, N. - Mashayekhi, S. (2023). Molecular Analysis for Cold Hardiness by Using COR Primers in Some Apricot Mutant Clones. *Erwerbs-Obstbau*, 1375–1381. DOI: [10.1007/s10341-023-00907-7](https://doi.org/10.1007/s10341-023-00907-7)
- Horváth (1994). Kevés a kajszai. *Kertészet és szőlészet*, 1994 (26), 16.
- International Plant Selection.(2024) *Bi-colour apricots*. International Plant Selection honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 04. 03. Forrás: <https://www.ips-plant.com/en/plantes/46-bi-colour-apricots/7-carmingo-farclo-cov.htm>
- Jarcho, J. (2001). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*, Paper: Chapter 2: Unit 2.7, 15 p. DOI: [10.1002/0471142905.hg0207s01](https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0207s01)
- Krška, B. - Vachůn, Z. (2016). Apricot Breeding at the Faculty of Horticulture in Lednice. *Agronomy*, 2016, 6(2), 27. DOI: [10.3390/agronomy6020027](https://doi.org/10.3390/agronomy6020027)
- Layne, R. (1991). 'Harval' Apricot. *HortScience*. 26(4), 424-425. DOI: [10.21273/HORTSCI.26.4.424](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.4.424)
- Linhart, C. - Shamir, R. (2005). The degenerate primer design problem: theory and applications. *J Comput Biol.*, 12(4), 431-56. DOI: [10.1089/cmb.2005.12.431](https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431)
- Mendel Á. (2024) Szóban közölt információ. Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kertészettudományi Intézet Gyümölcsstermesztési Kutató Központ, Ceglédi Kutatóállomás.
- Martin, E. - Feit, B. - Requier, F. - Friberg, H. - Jonsson, M. (2019). Chapter Three - Assessing the resilience of biodiversity-driven functions in agroecosystems under environmental change. *Advances in Ecological Research*, 60, 59-123. DOI: [10.1016/bs.aecr.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/bs.aecr.2019.02.003)
- Mendelné Pásztai, E., & Mendel, Á. (2021a). Ceglédi Bájós: The New Hungarian-Bred Apricot Cultivar.56(10), *HORTSCIENCE*, 1297–1298. DOI: [10.21273/HORTSCI16055-21](https://doi.org/10.21273/HORTSCI16055-21)
- Mendelné Pásztai, E., & Mendel, Á. (2021b). Ceglédi kajszifajták fagytűrésének vizsgálata szabadföldi felvételezések alapján. *Acta Agronomica Óváriensis*. Letöltés dátuma: 2024. 01. 10. Forrás: https://www.researchgate.net/publication/357992334_CEGLEDI_KAJSZIFAJTAK_F_AGYTURESENEK_VIZSGALATA_SZABADFOLDI_FELVETELEZESEK_ALAPJAN

- National Center for Biotechnology Information. (2024b). *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*. NCBI honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 03. 03. Forrás: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>
- National Center for Biotechnology Information. (2024c). *Sequence-Tagged Sites (STS)*. NCBI honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 03. 03. Forrás: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techsts/>
- National Center for Biotechnology Information. (2024a). *Taxonomy browser*. NCBI honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 01. 10. Forrás: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=36596>
- Németh, S. (2012). *A virágrügy-és gyümölcsfejlődés fenológiai, morfológiai és biokémiai jellemzése fontosabb kajszfajták esetén*. [PhD-értekezés]. Budapest: Kertészettudományi Doktori Iskola. Forrás: http://phd.lib.uni-corvinus.hu/614/1/Nemeth_Szilvia.pdf
- Olson, M. - Hood, L. - Cantor, C. - Botstein, D. (1989). A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245(4925) 1434-1435 DOI:[10.1126/science.2781285](https://doi.org/10.1126/science.2781285).
- Promega Corporation. (2024). *GoTaq G2 DNA Polymerase Complete Protocol*. Promega Corporation honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 03. 03. Forrás: www.promega.com
- Rai, M. (2023). Start codon targeted (SCoT) polymorphism marker in plant genome analysis: current status and prospects. *Planta*, 257 (34), 19 p. DOI [10.1007/s00425-023-04067-6](https://doi.org/10.1007/s00425-023-04067-6)
- Shan, G. (2010). RNA interference as a gene knockdown technique. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(8), 1243-1251. DOI: [10.1016/j.biocel.2009.04.023](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.04.023)
- Szabó, P. (2024). A gazdák rémálma: növekvő tavaszi fagykárokat és termés kiesést hozhat a klímaváltozás a jövőben Magyarországon. *Másfelfok*. Letöltés dátuma: 2024. 04. 10. Forrás: <https://masfelfok.hu/2024/04/09/gazdak-remalma-tavaszi-fagykar-termeskieses-szabolcsi-alma-klimavaltozas-magyarorszag-gyumolcs/>
- Szalay, L. (2001). *Kajszi-és őszibarackfajták fagy-és téltűrése*. [PhD-értekezés]. Budapest: Kertészettudományi Doktori Iskola. Forrás: https://phd.lib.uni-corvinus.hu/378/2/szalay_laszlo_thu.pdf
- Szalay, L. - Bakos, J. - Tótsaki, Á. - Froemel-Hajnal, V. (2021). Kajszfajták virágrügyeinek és virágainak fagytűrése. *Kertgazdaság*, 53(2), 3-15. Letöltés dátuma: 2024. 01. 10. Forrás: https://kertk.szie.hu/sites/default/files/files/Kertgazdasag/2021_junius/3-15_szalay.pdf
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2024) *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis*. Thermo Fisher Scientific Inc honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 04. 03. Forrás: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/restriction-fragment-length-polymorphism-rflp-analysis.html>

- Tripodi, P. (2023). The Evolution of Molecular Genotyping in Plant Breeding. *Agronomy*, 13(10), 2569. DOI: [10.3390/agronomy13102569](https://doi.org/10.3390/agronomy13102569)
- Viti, R. - Bartolini, S. - Guerriero, R. (2006). Apricot floral biology: The evolution of dormancy and the appearance of bud anomalies in several Italian genotypes. *Horticultural Science*, 20(4), 267-274. Letöltés dátuma: 2024. 01. 10. Forrás: https://www.researchgate.net/publication/279654207_Apricot_floral_biology_The_evolution_of_dormancy_and_the_appearance_of_bud_anomalies_in_several_Italian_genotypes
- Vos, P. - Hogers, R. - Bleeker, M. – Reijans - M., van de Lee - T., Hornes, M. - Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. DOI: [10.1093/nar/23.21.4407](https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407)
- Walbot V., Warren C. (1988) Regulation of Mu element copy number in maize lines with an active or inactive Mutator transposable element system. *Mol. Gen. Genet.* 211(1), 27-34. DOI: [10.1007/BF00338389](https://doi.org/10.1007/BF00338389)
- Wotsenboer, H. - Michelmore, R. - Vogel, J. (1997). Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (*Lactuca* spp.). *Genome*, 40(6), 923-36. DOI: [10.1139/g97-119](https://doi.org/10.1139/g97-119)
- Wunderlich, L. (2021). *Molekuláris biológiai technikák*. [Elektronikus kiad.] Interkönyv, 2021. Letöltés dátuma: 2024. 03. 01. Forrás: <https://edu.interkonyv.hu/konyvek/wunderlich-molekularis-biologiai-technikak/>
- Xiong, F. - Zhong, R. - Han, Z. - Jiang, J. - He, L. - Zhuang, W. - Tang, R. (2011). Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties. *Mol Biol Rep.*, 38(5), 3487–3494. DOI: [10.1007/s11033-010-0459-6](https://doi.org/10.1007/s11033-010-0459-6)
- Záhradníctvo Limbach. (2024) *Apricot (Prunus armeniaca) TSUNAMI*. Záhradníctvo Limbach honlapja. Letöltés dátuma: 2024. 04. 03. Forrás: <https://www.shop.zahradnictvolimbach.sk/en/tsunami-apricot-trees>
- Zalunskaitė, I. - Rugienius, R. - Vinskiene, J. - Bendokas, V. - Gelvonauskienė, D. - Stanys, V. (2008). Expression of COR gene homologues in different plants during cold acclimation. *Biologija*, 54(1), 33-35. DOI: [10.2478/v10054-008-0007-7](https://doi.org/10.2478/v10054-008-0007-7)

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Dobóvári Éva
A Hallgató Neptun kódja: GL43G6
A dolgozat címe: A kajszi hidegtűrésének molekuláris genetikai vizsgálata
A megjelenés éve: 2024
A konzulens intézetének neve: Genetika és Biotechnológia Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Genetika és Genomika 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 állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

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

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem 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: 2024. év április hó 22. nap



Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

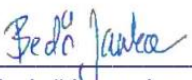
NYILATKOZAT

Dobóvári Éva (hallgató Neptun azonosítója: GL43G6) 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: 2024. év április hó 22. nap


belső konzulens

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

³ A megfelelő aláhúzendő.