

DIPLOMADOLGOZAT

Szabó Eszter
Mezőgazdasági biotechnológus Msc.

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
2024.



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Genetika és Biotechnológia Intézet

Mezőgazdasági biotechnológus

mesterképzési szak

Evaluation of genetic relationship between bamboo species

Belső konzulens: Dr. Veres Anikó
egyetemi docens

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** Genetika és
Genomika Tanszék

Társkonkulens: Khin Nyein Chan
doktorandusz

Készítette: Szabó Eszter

2024.


NYILATKOZAT

Szabó Eszter, DTF990 konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Gödöllő év 2024. ok. hó 27. nap



belső konzulens

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Bambusz felhasználása	4
2.2. Elterjedés és morfológia	6
2.3. Szaporítás.....	9
2.3.1. Generatív szaporítás	9
2.3.2. Vegetatív szaporítás.....	10
2.4. <i>Phyllostachys</i> nemzetség.....	12
2.5. Molekuláris markerek.....	16
2.5.1. SSR markerek a bambuszban	19
2.6. Az SSR vizsgálatokhoz alkalmazható berendezések	23
2.6.1. NanoDrop készülék	23
2.6.2. PCR készülék.....	23
2.6.3. Agaróz gélelektroforézis	25
3. Anyag és módszer.....	26
3.1. Növényanyag	26
3.2. Primerek	26
3.3. Módszerek	27
3.3.1. DNS izolálás	27
3.3.2. PCR	28
3.3.3. Agaróz gélelektroforézis	28
3.3.4. ALF Express.....	29
4. Eredmények.....	34
4.1. DNS izolálás.....	34
4.2. PCR eredmények.....	35
4.3. ALF eredmények	38
4.4. Dendogram	39
4.5. Eredmények kiértékelése	40
5. Következtetések és javaslatok.....	43
6. Összefoglalás	44
7. Irodalomjegyzék	45

8. Táblázatok és ábrák jegyzéke	48
8.1. A diplomadolgozatban szereplő ábrák	48
8.2. A diplomadolgozatban szereplő táblázatok	Hiba! A könyvjelző nem létezik.

1. Bevezetés

Diplomamunkám célja olyan molekuláris markerek keresése, melyek segítségével a bambuszok- azon belül a *Phyllostachys* nemzetség- fajtái és változatai DNS szinten könnyen elkülöníthetők egymástól. Erre azért van nagy szükség, mert a növény vegetatív és generatív fázisai elhúzódhatnak, valamint bizonyos fajtákat, illetve fajtákon belüli változatokat morfológiai eltérések alapján nem mindig lehet egyértelműen azonosítani. A molekuláris markerek alkalmazásával lehetőség van gyorsan és hatékonyan különbséget tenni a genotípusok között, valamint azonosítani tudjuk a kérdéses egyedeket. A kutatásunk során SSR markereket használtunk, melyek mikroszatellit régióra tervezett molekuláris markerek. A mikroszatellit 1 és 6 bázispár közötti ismétlődő motívumok. Ezek a régiók a legtöbb esetben nem kódoló területeken fordulnak elő, ezért ha mutáció történik ebben a szakaszban, és ismétlődés számuk megváltozik az jó eséllyel nem jelent szelekciós hátrányt, és a változás fennmarad. A genotípusok megkülönböztetésére kiválóan alkalmas, mert egyedenként adott lókuszokban az ismétlődés hossza eltérő lehet. A bambusz gyorsan növekszik, minimális a fenntartási költsége, kiváló a regenerációs képessége, betakarítás után képes új hajtásokat regenerálni és magas a terméshozama. Ezen tulajdonságainak köszönhetően a bambusz termesztése, kereskedelme és hasznosítása világszerte nagy jelentőséggel bír. A bambuszok felhasználása nagyon sokrétű. Fontos alapanyag a papírgyártásban, bútorkészítésben, építkezéseken, a bambuszrügy pedig alapvető élelmiszerként szolgál már évezredek óta. A megfelelő SSR marker segítségével DNS ujjlenyomat készítése volt a cél, amelynek segítségével nem csak a bambusz fajták, és a fajták változatait vagyunk képesek elkülöníteni egymástól, de a magoncok, és a klónok esetén előforduló eltéréseket is felismerhetjük. Ha sikerül kapcsoltságot találunk az alkalmazott markerek és egyes fontos értékmérő tulajdonságok között, akkor az adott tulajdonságra irányuló szelekcióra is alkalmazhatóak az eredmények.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Bambusz felhasználása

A bambusz felhasználása kulcsfontosságú szerepet játszik Ázsia történelmében, az ázsiai kultúra és civilizáció fejlődésének egyik fő szimbóluma. 4000-5000 évvel ezelőtt már nyílhegyeket faragtak belőle, az ókorban használták építkezéshez, kosarakat fontak belőle, tűzifaként alkalmazták a főzés során, bambusz sapkákat és cipőket készítettek, bambusz tekercseket használtak íráshoz, és a bambuszrügyet előszeretettel fogyasztották. Az európai felfedezők a 16. században hozták be Európába a bambuszt, ahol főként dekorációs célokra alkalmazták. Napjainkra a bambusz az egyik legértékesebb erőforrás, fontos eleme az ázsiai civilizációnak és az ott élő emberek mindennapi életének. Az 1. táblázat mutatja, hogy a bambusz rengeteg hasznosítási lehetőséget rejt magában, és hogy minden felhasználási területhez különböző bambusz fajokat alkalmaznak. (Dlamini, 2022.)

1. táblázat: A bambusz fajok felhasználásának főbb területei

(Forrás: (Dlamini, 2022.))

Felhasználási terület	Fő alkalmazás	Bambusz faj
Fa-, és papíripar	Mennyezet és padló; tartógerenda; papír	<i>Bambusa lapidea</i> ; <i>Bambusa ripisa</i> ; <i>Phyllostachys edulis</i> ; <i>Dendrocalamus membranaceus</i>
Élelmiszer	Szárított vagy friss hajtások, rügyek; konzerv termékek, bambuszrügy	<i>Phyllostachys edulis</i> ; <i>Phyllostachys vivax</i> ; <i>Fargesia robusta</i> ; <i>Fargesia nitida</i>
Bútorok és háztartási cikkek	Kosarak; székek; asztalok; írástekerics; belső falak	<i>Bambusa textilis</i> ; <i>Bambusa chungii</i> ; <i>Indosasa sinica</i>
Kézműves termékek és művészet	Szobrok; növénytartók; gitárok	<i>Neosinocalamus affinis</i> ; <i>Bambusa textilis</i> ; <i>Bambusa chungii</i>
Ökológiai	Biodiverzitás növelésése, oxigéntermelés, szén megkötése	<i>Phyllostachys edulis</i> ; <i>Bambusa sinospinosa</i> ; <i>Dendrocalamus giganteus</i>
Ökoturizmus	Tájkép szépítése	<i>Cephalostachyum pergracile</i> ; <i>Phyllostachys nigra</i> ; <i>Phyllostachys aurea</i> ; <i>Bambusa tuldoides</i>

A bambusz népszerűségét leginkább annak köszönheti, hogy a hagyományos fakitermeléssel szemben megújuló erőforrásnak számít, gyorsan növekszik, magas a terméshozama, könnyen fenntartható és kiváló a regenerációs képessége. Manapság világszerte egyre fontosabb, hogy környezetbarát alternatívákat használjunk. Ennek a kritériumnak a bambusz tökéletesen megfelel. Ezen felül még számos egyéb hasznos tulajdonsága ismert, ellenáll a kártevőknek, és a zord időjárási viszonyoknak, ezért remek építőipari alapanyag. Népszerű bútoranyag, mivel könnyű, tartós és vonzó esztétikája van. Padlóként lepergeti a vizet és tűri a nedvességet, több színben és mintázatban kapható. Magas rosttartalma miatt a papírgyártásban is remekül felhasználható, némelyik faj, például a *Schizostachyum brachycladum*, vagy a *Bambusa vulgaris* akár 50% cellulózt is tartalmazhat. Előszeretettel alkalmazzák a gyógyításban légúti, vagy emésztési problémák kezelésére, de a bambuszport használják a szépségiparban is, feszesíti és puhábbá teszi a bőrt. A bambuszrügyek alacsony kalóriatartalmúak, általában legalább 1,5-4,0% fehérjét tartalmaznak, gazdagok aminosavakban, tehát remek tápanyagforrást biztosítanak. A bambuszrügyben nagy mennyiségben találhatóak vitaminok és ásványi anyagok, köztük B6-vitamin, kálium és réz. (Dlamini, 2022.) Ezen ismerve alapján nem meglepő, hogy termesztése fontos, és a bambusz erdők területei folyamatosan növekednek. Az 1. ábrán látható néhány a bambusz felhasználási lehetőségeiből.



1. ábra: Bambusz felhasználási területei
(Forrás: Saját szerkesztés)

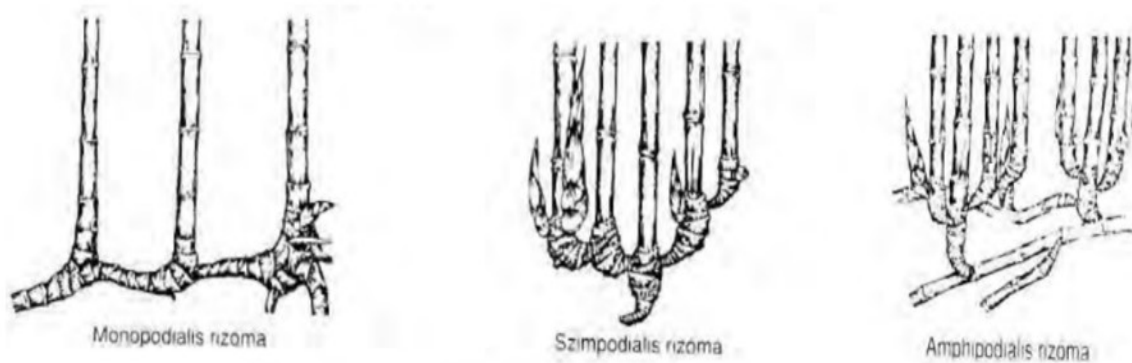
2.2. Elterjedés és morfológia

A világ bambuszfajainak körülbelül 80%-a, és a bambusz erdők legnagyobb hányada Kelet-, Dél-, és Délkelet-Ázsiában található. Ezen belül Kína rendelkezik a legnagyobb diverzitással, összesen 861 fajjal, 43 nemzetségből. Kínában a bambusz erdők területe körülbelül 6,73 millió hektár, amely az egész világon található bambusz erdők egyharmadát teszi ki. A bambusz számtalan felhasználási lehetőségének köszönhetően az erőforrások bővítése folyamatos a megnövekedett kereslet miatt. A legtöbb bambusz ültetvényen intenzív gazdálkodást folytatnak a termelés maximalizálása érdekében. A legnagyobb területen körülbelül 4,43 millió hektáron Moso bambusz, más néven *Phyllostachys pubescens* található. Ázsián kívül Amerikában és Afrikában fordulnak még elő bambusz erdők, de ezeknek a mérete jóval kisebb. (Lobovikov, et al., 2007.)

A bambuszok morfológiáját tekintve három csoportot különítünk el: szimpodialis, monopodiális, és amfipodiális. A szimpodialis fajok július és augusztus hónapokban kezdik el az új hajtásokat hozni, így ahhoz hogy a száraik kellő képen megerősödjenek, több időre van szükségük, a tél megérkezéséig. Így ezek a fajok nem viselik jól a hideget és a szubtrópusi, trópusi övezetben találhatóak. Ebbe a csoportba sorolható többek között az *Ampelocalamus*, *Bambusa*, *Fargesia*, *Melocalamus*, és *Dendrocalamus* nemzetség. A monopodiális és amfipodiális fajok a trópusi, szubtrópusi övezetek mellett elterjedtek a mérsékelt övi zónában is. Ez annak köszönhető, hogy nagy az ellenálló-, és alkalmazkodóképességük. A monopodiális kategóriába tartozik például a *Phyllostachys*, *Indosasa*, *Ferrocalamus* nemzetség. Az amfipodiális bambuszok a felépítésüket tekintve a monopodiális és a szimpodialis bambuszok keveréke, ide sorolható a *Bashania*, *Sasa* és *Indocalamus* nemzetség. (Tihanyi-Kósa, 1998.)

A bambuszok évelő növények, melyek a fűfélék családjába tartoznak, de több fizikai tulajdonságuk is, mint például flexibilitás, rugalmasság, és szilárdság inkább a fákéhoz hasonló. További sajátos jellemzői is vannak, melyekkel kitűnnek a növényvilágból, többek között, hogy hajtásaik átmérője egész életükben ugyanakkora marad. Az átmérő csak akkor változik, ha a körülmények optimálisak, ilyenkor évről-évre egyre magasabb és vastagabb szárat növeszt a teljes kifejltség eléréséig. Ezt követően a szárok száma, és a lombzat gazdagodik. Másik egyedi jellegzetessége, hogy hajtásaik csak a vegetációs periódus alatt növekednek, az azt követő évben viszont már nem. (Calderón, et al., 1980.)

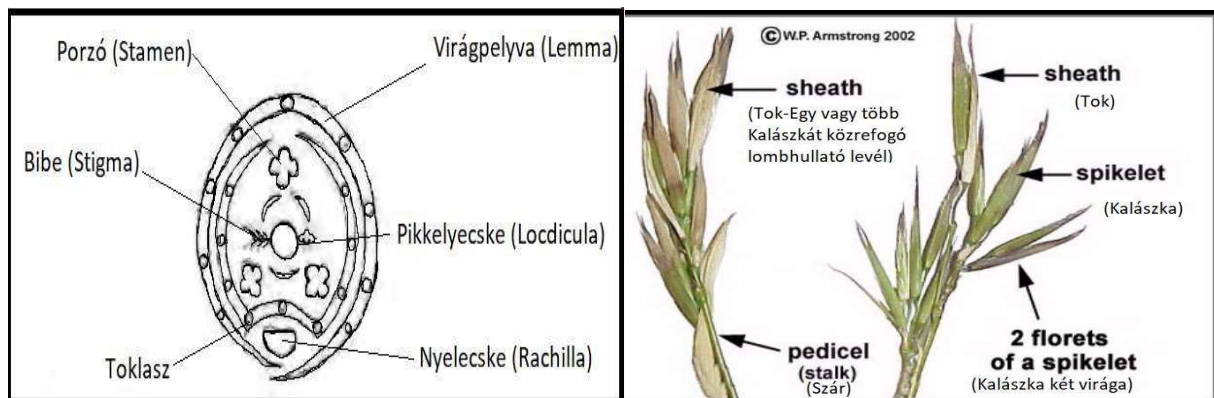
Föld feletti hajtásrendszere szárból, levelekből, ágakból és virágokból áll. Föld alatti hajtásrendszere a rizóma, mely felépítése igen hasonló a föld feletti részekhez. A rizóma, ahogy a szár is nódusokból, más néven szárcsomókból áll, köztük pedig internódusok, szárközök találhatóak. Feladata, hogy elég tápanyagot raktározzon a nódusokon fejlődő rügyek és valódi gyökér számára. A bambuszok agresszív terjedését az teszi lehetővé, hogy a rizómacsúcs, ahol a sejtosztódás, növekedés zajlik nagyon kemény, ezáltal kötött talajon is átjut. (Zhang, et al., 2021.) A rizóma felépítése különböző a monopodiális, szimpodiális és amfipodiális bambuszoknál, melyet a 2. ábra szemléltet.



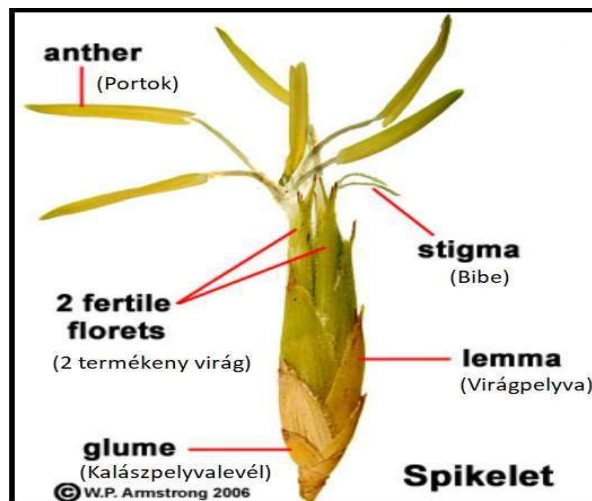
2. ábra: A különböző rizómák felépítése
(Forrás: (Tihanyi-Kósa , 1998.))

A szimpodiális bambuszokra, a pachymorf rizóma jellemző, mely vastag és masszív, a szárközei rövidek. Sajátossága, hogy a nóduson lévő rügyekből csak rizómát fejleszt. A föld feletti hajtások a rizómacsúcsnál fejlődnek ki. A szárok közel helyezkednek el egymáshoz, kis területen, nagy bambusztöveket képes növeszteni. A monopodiális bambuszokra, ahova a hidegtűrő *Phyllostachys* nemzetség is tartozik, a monopodiális vagy más néven leptomorf rizóma jellemző. Ennél a típusnál hosszú és vékony hajtásrendszer alakul ki a talaj alatt, mely segítségével nagy távot képesek megtenni a keletkezésük helyétől. A legnagyobb eltérés a többi gyöktörzshöz képest a nódusokon található alvórügyek funkciójában van, a rizómákon kívül, szárok is növekedhetnek belőlük. Az amfipodiális, vagy más néven intermedier rizóma a monopodiális és szimpodiális rizómák keveréke. Minden rizómához egy meghosszabbodott rizómányak tartozik. Maga a rizóma monopodiális, viszont az oldalrügyeiből fejlődő rizómák szimpodiálisak. Ennek következménye, hogy a föld feletti hajtásaik csoportosan helyezkednek el, viszont a szimpodiális fajokhoz képest távolabb egymástól. (Tihanyi-Kósa, 1998.)

A bambuszok virága összetett füzérvirágzat. A száron elágaznak az úgynevezett kalászkák, melyeket általában kettő kaláspályvalevél (Gluma) fog össze, ennek száma a fajtától függően különbözhet, illetve néhány fajta esetében teljesen hiányzik. A kalászkák minden esetben több virágból állnak, zöldes árnyalatúak. A nyelecske (Rachilla) ágai felelősek a toklász és a virág komponenseinek tartásáért, minden virágpelyvával (Lemmával) szemben egy darab figyelhető meg belőle. A 3. és 4. ábrák jól szemléltetik a bambusz virágzatának felépítését. (Tihanyi-Kósa, 1998.)



3. ábra: *Phyllostachys aureosulcata* virágzatának keresztmetszete és felépítése
(Forrás: (Tihanyi-Kósa, 1998.), <http://www.waynesword.net/ecoph39.htm>)



4. ábra: *Phyllostachys aureosulcata* kalászkájának felépítése
(Forrás: <http://www.waynesword.net/ecoph39.htm>)

A virágképzés során a Lodiculák megtelnek vízzel és megduzzadnak. Ennek hatására a virágpelyva, és a pályvalevek elválnak egymástól. Ez lehetővé teszi, hogy a bibék és a portokok kinyúljanak a virágból. Ilyenkor érintés hatására, vagy a szél segítségével köszönhetően képesek a pollenjeik szétszórására. Ez jellemzően a hajnali, koradélelőtti

időszakban következnek be. (Recht-Wetterwald, 1992.) A bambuszok termékenyülési típusa a keresztmegporzás, ezzel a módszerrel hatékonyabban tudnak magot termelni, mint önmegporzással. A pollen attól függően, hogy a bambusz a mérsékeltövről, vagy a trópusokról származik különböző méretű, előbbi 90-95 mikron, míg az utóbbi 30-35 mikron. A virágzás általában júliusban kezdődik, és a következő évben érlelnek magot. (Liese-Köhl, 2015.)

2.3. Szaporítás

A bambusz szaporítható vegetatív, más néven ivartalan, és generatív, más néven ivaros módon. Szaporítása viszonylag egyszerű, és elengedhetetlen a termesztéshez. A bambusz vegetatív módon szaporítható szövetkultúrái és növényi részei által például rizómák, szárok és ágak, generatív módon pedig a magokat felhasználva.

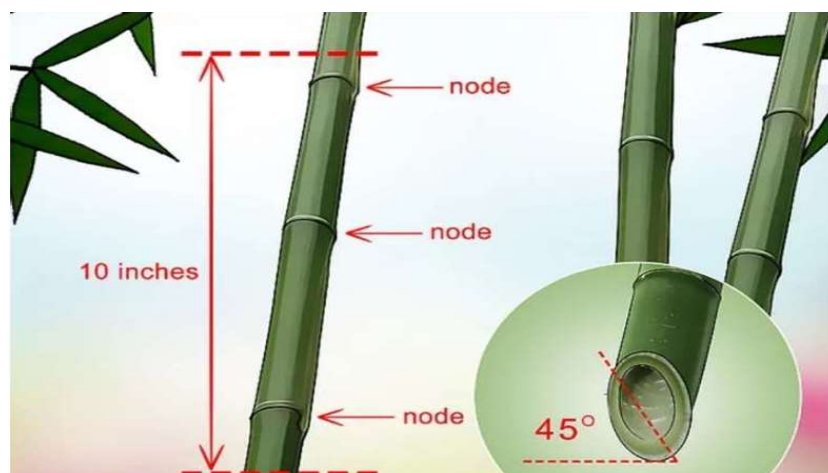
2.3.1. Generatív szaporítás

A generatív szaporításnak nincs nagy jelentősége a bambuszoknál, főleg a *Phyllostachys* nemzetség esetében a magok beszerzése nehezen kivitelezhető. Ennek egy szokatlan jelenség az oka, hogy az ide sorolható fajok virágzásáról szóló feljegyzések szerint, a *Phyllostachys* minden 120. évben virágzik, és virágzása több éven keresztül is eltarthat. De nem csak ebben a tekintetben tér el ez a nemzetség más növényektől, hanem abban is, hogy annak ellenére, hogy évelő, monokarpikus szeneszcencia jellemzi. Ez azt jelenti, hogy hasonlóan az egyéves növényekhez, a mag kialakulásához használják fel a raktározott tápanyagokat, ezért a virágzás akár a növény elpusztulásához is vezethet. A bambuszok esetében gyakori, hogy a rizómákból ismét szárok fejlődnek, illetve a magokról is keletkeznek új hajtások, ezért itt nem a növény elhalásáról beszélünk, inkább az állomány megújulásáról. Arról, hogy milyen tényezők idézik elő a virágzást még nincsenek pontos feljegyzések, egyes fajoknál alkalomszerű, másoknál valószínűleg vízhiány vagy egyéb stressz okozza. (Zhang, et al., 2022.) A virágzás évében nem, csak a következő évben érlelnek magot. A magok nem alkalmasak arra, hogy több évig tárolják őket, mert hamar elveszítik csíráképességüket. Magához a magvetéshez nincs szükség különösebb szaktudásra vagy felszerelésre. A magokat elvethetjük homokos, vagy kerti földbe, a legjobb eredményt viszont olyan földkeverékkel lehet elérni, mely tápanyagban gazdag. Ajánlott tőzeget keverni a magágyhoz, ami segíti a laza szerkezet kialakítását, és a vízháztartásnak is kedvez. A csírázást segíti, ha a magokat egy órán át vízben áztatjuk, és csak

utána szórjuk ki az előkészített ágyásba, majd körülbelül 1 centiméter vastag talajréteggel fedjük le. Ezután a magoncoknak biztosítani kell egy meleg helyet, aminek magas a páratartalma, a megfelelő nedvességet öntözéssel biztosítjuk. Megfelelő körülmények között körülbelül 3-8 hét szükséges, mire először megjelennek a fűszálhoz hasonló hajtások, ezt befolyásolja az is, hogy milyen fajtát vetettünk. (Lessard-Chouinard, 1980.) Vannak a bambuszok között is kivételek, például a *Pseudosasa* és a *Sasa* fajok gyakrabban érlelnék magot, körülbelül 5 évente, ezeket elhullajtják és beavatkozás nélkül is kicsíráznak. Az így kikelt növénykéket ki lehet ásni a talajjal együtt, és kaspóban nevelni amíg megerősödnek. Magról szaporítva 3-4 év szükséges, amíg a magoncból életerős növény fejlődik. (Nautiyal, et al., 2008)

2.3.2. Vegetatív szaporítás

A bambuszok főként vegetatív módon szaporodnak, illetve szaporíthatók. A termesztők használhatnak szár dugványokat, ebben az esetben a szárat több darabra vágják. A dugványok 3-4 nódusz hosszúságúak. Ajánlott a szárat hozzávetőlegesen 45 fokban elválni, majd gyökereztető porba mártani, és így a földbe helyezni. A felső részen található friss vágást viasszal kezelik, ügyelve, hogy csak a szár peremét kenjék be vele. Az így keletkezett dugványokat nedves közegbe dugják le, ez lehet homok vagy kerti talaj. A friss dugványoknak biztosítani kell a megfelelő páratartalmat, és hőmérsékletet, gyakran egyszerűen csak fóliával takarják le a már földbe helyezett szárat. Megfelelő körülmények között 2-3 hónap alatt megjelennek az új hajtások. Az 5. ábra szemlélteti, hogyan készülnek a dugványok. (Rao, et al., 1987.)



5. ábra: Bambusz dugványok vágásának módja
(Forrás: <https://www.wikihow.com/Propagate-Bamboo>)

A következő lehetőség, egy egyszerű technika, amely időt és munkát takarít meg a többi szaporítási módszerhez képest, ezért széles körben elterjedt az Indiai közösségek körében. Egy legalább egy éves szár közepéből kivágnak egy hozzávetőlegesen egy méter hosszú darabot, majd körülbelül fél méter mélyre a földbe fektetik. Fontos, hogy a szár egészséges legyen. A nódusok között lyukakat készítenek rajta, melyet vízzel töltenek fel, lezárnak majd betemetnek. Ezután a talaj felső rétegét folyamatosan nedvesen tartják. Ezt a technikát kora tavasszal, március-április hónapban alkalmazzák, és már 15-20 napon belül megjelennek az első hajtások. Amikor gyökér és a szár kifejlődött az internódusokból, a szárat a nódusok mentén elvágják, így hoznak létre új növényeket. (Nautiyal, et al., 2008) A 6. ábrán látszik a szár megfelelő előkészítése.

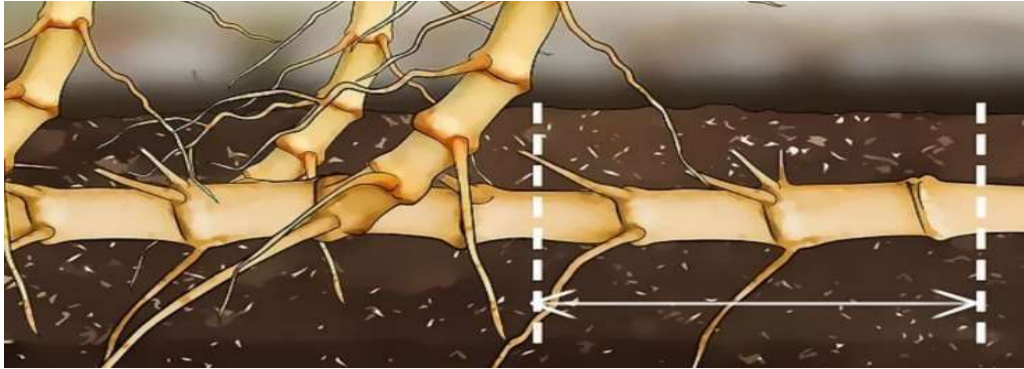


6. ábra: Bambusz szár földbe fektetése

(Forrás: <https://www.caritasindia.org/blogs/bamboo-propagation-technique/>)

A rizómáról való szaporítás az előző módszerekhez képest bonyolultabb, és több szakértelmet igényel. A legfontosabb a megfelelő rizóma kiválasztása, a legalkalmasabbak a hároméves föld alatti hajtások. A túl fiatal rizóma esetében nem áll rendelkezésre elég elraktározott tápanyag ahhoz, hogy képes legyen a csírázásra, ha pedig túl időset választunk akkor a reprodukciós képesség hiányában nem fog kialakulni az új hajtás. Azt is figyelembe kell venni, hogy melyik időszakot választjuk a szaporításhoz, erre a leginkább alkalmas a rügyfakadás kezdete. Az ideális korban lévő föld alatti hajtásrendszer egy részét kiássák, körülbelül 20-30 cm hosszú részekre vágják, majd konténerekbe ültetik úgy, hogy a rügycsúcsok ne lefelé nézzenek.

Legjobban jó víz elvezetésű, tápanyagdús talajban fejlődnek. Mivel a bambuszok a trópusi, és szubtrópusi éghajlatú területeken nőnek vadon, a termesztéséhez is hasonló körülményeket kell biztosítani. A 7. ábra mutatja, a rizóma feldarabolásának módját. (Rao, et al., 1987.)



7. ábra: Rizóma feldarabolása

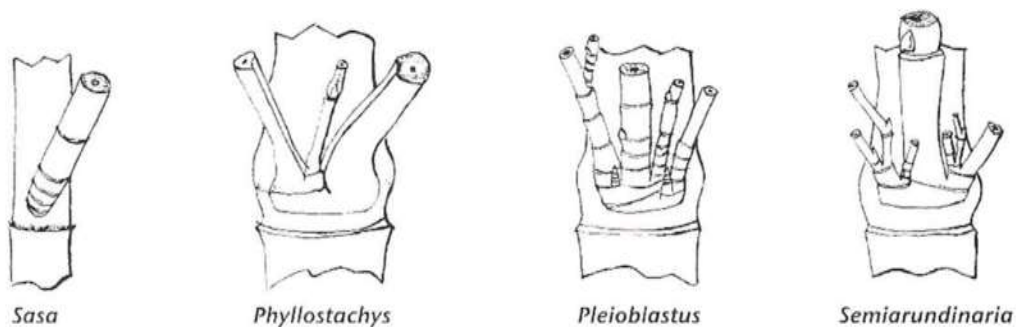
(Forrás: <https://de.wikihow.com/Bambus-vermehren>)

A legmodernebb technológiája a vegetatív szaporításnak a mikroszaporítás. Előnye, hogy kis mennyiségű alapanyag használatával, valamelyik szerv osztódószöveiteiből, nagyon sok utódnövény hozható létre. A bambusz esetében a csúcshajtás merisztéma alkalmazása a jellemző. A sejteket *in vitro* körülmények között, steril táptalajon nevelik. A módszer előnye nem csak a nagyszámú utód létrehozásának lehetősége, hanem hogy olyan egyedek választhatók ki, és szaporíthatók fel, melyek a számunkra leghasznosabb tulajdonsággal rendelkeznek. Sajnos a bambusz ezzel a technikával nehezen szaporítható, sikereket eddig a *Dendrocalamus asper*, és a *Bambusa bambos* fajoknál érték el. (Tihanyi-Kósa , 1998.)

2.4. *Phyllostachys* nemzetség

A *Phyllostachys* nemzetség a Zárva termők (*Magnoliophyta*) törzsén belül az Egyszikűek (*Liliopsida*) osztályába, a Perjevirágúak (*Poales*) rendjébe, a Perjefélék (*Poaceae*) családjába, a Bambuszformák (*Bambusoideae*) alcsaládjába, az *Arundinarieae* bambusz törzshöz tartozik, ezen belül pedig az *Arundinariinae* altörzshöz. A nemzetségbe 75 fajt sorolunk, és több mint 200 fajtája ismert, melynek többségének Kelet-Ázsia a természetes élőhelye. Az itt élők számára kiemelt jelentőségű ez a nemzetség, bambuszrügyeit előszeretettel fogyasztják, de az építőiparban, vagy a bútorgyártásban is fontos szerepet játszik. Európában főként örökzöld

dísznövényként terjedt el, a kertészek körében különösen kedvelt mivel jó a télállósága, hidegtűrő. A nemzetséget feltételezhetően 1843-ban honosították német botanikusok. Számunkra különös jelentőséggel bír, mivel Magyarországon ez a nemzetség terjedt el a leginkább. Nálunk a bambusz meghonosodása pontosan nem meghatározható, de a napjainkban rendelkezésre álló adatok alapján a legidősebb képviselői hazánkban egy *Phyllostachys viridi-glaucescens* és egy *Phyllostachys aureosulcata*, melyek az 1950-es években kerülhettek egy magánkertbe, amely Lengyeltótiiban található. (Tihanyi-Kósa, 1998.) A nemzetség képviselői között főként közepes és nagyméretű fajok találhatóak, rizómájuk túlnyomó részben monopodiális, de bizonyos esetekben előfordul az amfipodiális föld alatti hajtásrendszer is. Általánosságban elmondható, hogy leveleik kis- vagy közepes méretűek, 7-15 cm hosszúak, szélességük pedig 1,3-2 cm között mozog. Jellemzőjük, hogy a levélerek mozaikszerűek. Az új levelek tavasszal jelennek meg, hogy az előző lombot leválsák. (Zhang, et al., 2022.) Szintén a nemzetségre jellemző, hogy virágzása körülbelül minden 120. évben következik be, és több éven át tart, ami annyira kimeríti a növényt, hogy az általában elpusztul. Közös jellemvonásuk még az ágak fejlődésének módja. A szárcsomók jól láthatóak, belőlük általában két ág fejlődik, előfordul, hogy a kettő között egy harmadik kisebb ág is kifejlődik. Ezt a 8. ábra szemlélteti. (Tihanyi-Kósa, 1998.)



8. ábra: Az *Arundinariinae* altörzshöz tartozó néhány nemzetség ágainak jellegzetes fejlődése (Forrás: (Kiss-Kiss, 2021.))

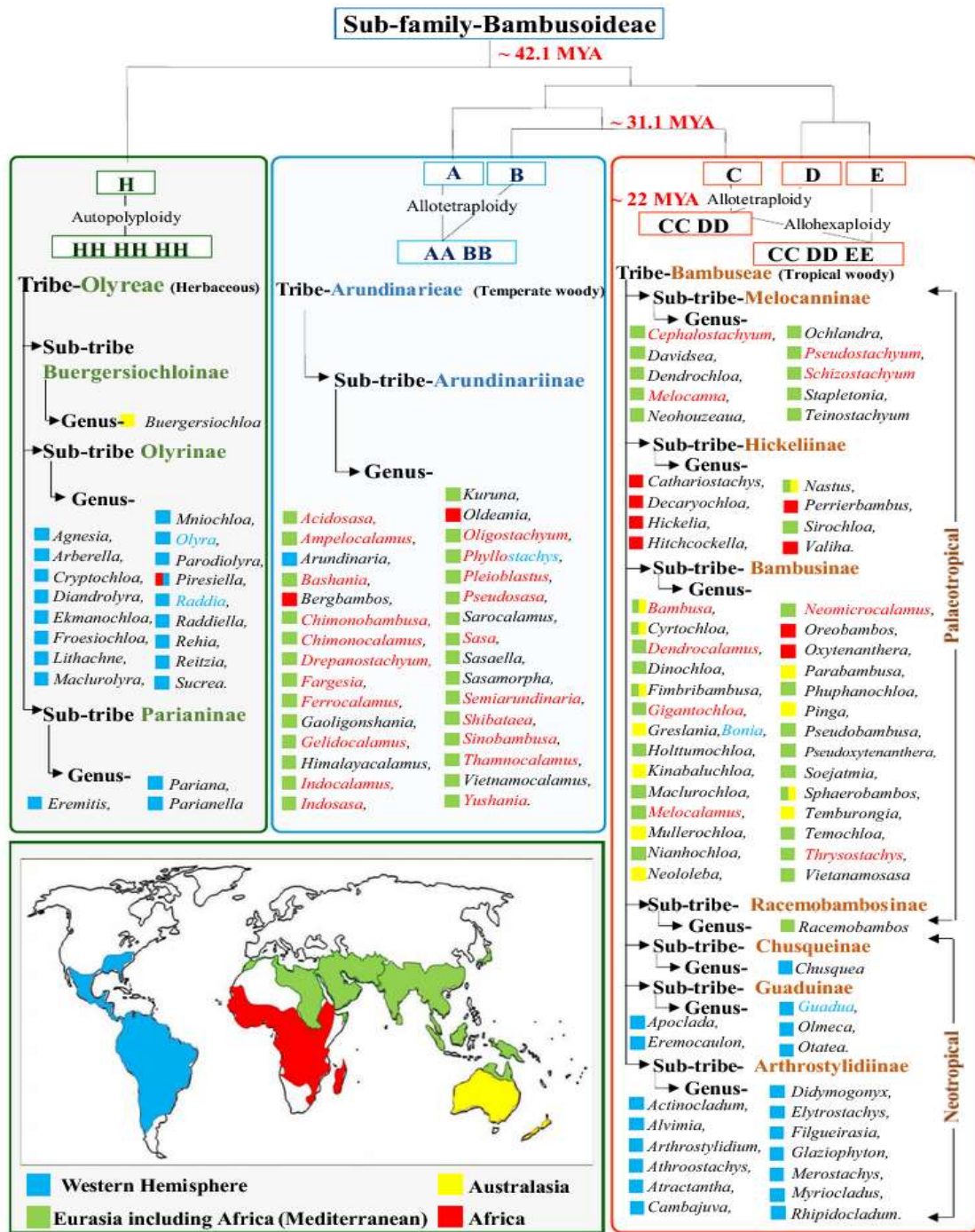
A *Phyllostachys* nemzetség tehát ágrendszerét tekintve a többi nemzetségtől könnyen elkülöníthető, ahogy a növekedés módja is egészen egyedi. A többi fás szárú bambusszal ellentétben a *Phyllostachys* fajoknál az ágak növekedése a szárral egyidejűleg indul meg, a bambusz alsó részétől felfelé haladva. Más fajoknál csak a szár növekedésének befejezése után kezdődik az ágak képzése, felülről lefelé. (Kiss-Kiss, 2021.) A nemzetségen belül

morfológiai jegyek alapján bizonyos fajok könnyen elkülöníthetők egymástól, a különbség általában a szár színében, mintázatában és vastagságában mutatkozik, ahogy a 9. ábra is mutatja.



9. ábra(balról jobbra): *Phyllostachys nigra*, *Phyllostachys Bambusoides 'Tanakae'* és *Phyllostachys vivax 'Huangwenzhu inversa'* szárai
(Forrás: Saját kép, MATE arborétum)

A nemzetség képviselői között azonban nem mindig egyértelmű a taxonómiai besorolás. Vannak olyan egyedek a faj alatti szinteken, melyeket csak külső jellemvonásaik alapján nehéz megkülönböztetni egymástól, főleg a vegetációs időszakon kívül. Ezért is fontos, olyan molekuláris markerek kutatása, melyek segítségével a nemzetségbe tartozó fajok egymástól DNS-szinten elkülöníthetők, illetve a bambuszfajok közötti genetikai kapcsolat feltárható. A genotípusok pontos ismerete nem csak a taxonómia helyes meghatározásában, de a bambusz különböző tulajdonságainak, mint például, virágzás, télállóság, szárszilárdság, vagy cellulóztartalom pontosabb megismerésében is nagy előrelépés lehet. A *Bambusoideae* alcsalád fás szárú tagjait citológiai vizsgálatok alapján, a ploid szintjük szerint két csoportra oszthatjuk. A trópusi fajok hexaploidok, a mérsékelt övi fajok pedig tetraploidok. A *Phyllostachys* nemzetségnek 48 kromoszómája van. (Li, et al., 2001.) A 10. ábra jól szemlélteti a *Bambusoideae* alcsaládba tartozó nemzetségek ploid szintjük szerinti felosztását, illetve elterjedését.



10. ábra: A *Bambusoideae* alcsaládba tartozó nemzetségek ploid szintjük szerinti felosztása és elterjedése (Forrás: (Mridushree, 2021.))

2.5. Molekuláris markerek

A markerek három kategóriába sorolhatók:

1. Morfológiai markerek: az általuk meghatározott fenotípusos tulajdonság alapján mutathatók ki. A genom kódoló részeiben találhatóak.
2. Biokémiai markerek: a géntermék fehérje jelzi a marker jelenlétét. Szintén a genom kódoló részeiben találhatóak.
3. Molekuláris markerek: maga a DNS-szekvencia alapján mutathatók ki. A genom kódoló és a nem kódoló részeit is lehet molekuláris markerként alkalmazni.

A molekuláris markerek genom szintű különbségtételre alkalmas szekvencia szakaszok. Segítségükkel vizsgálható bizonyos tulajdonságok genetikai háttere, felrajzolható a filogenetikai fa, vagy alkalmazhatjuk egy egyed meghatározására, ha erre a morfológiai markerek hiányában nincs lehetőség. (Agarwal, et al., 2008)

Mivel a molekuláris markerek, a DNS-ről adnak információt, és ez minden sejtben megegyezik, ezért már az első csíralevelekből, akár a magból is vehető minta. Az optimális marker ismérvei:

- öröklődése kodomináns
- polimorf
- a jelölések egyértelműek az egyes allélok esetében
- egyenletesen és gyakran fordul elő a teljes genomban
- gyorsan és könnyen vizsgálható, stabil, külső hatások nem befolyásolják, bármely szövetből, bármely fejlődési állapotban detektálható
- az eredmények más laboratórium eredményeivel összevethetők
- a vizsgálathoz kis mennyiségű DNS minta is elegendő
- a marker fejlesztése, és a vizsgálat nem túl költséges

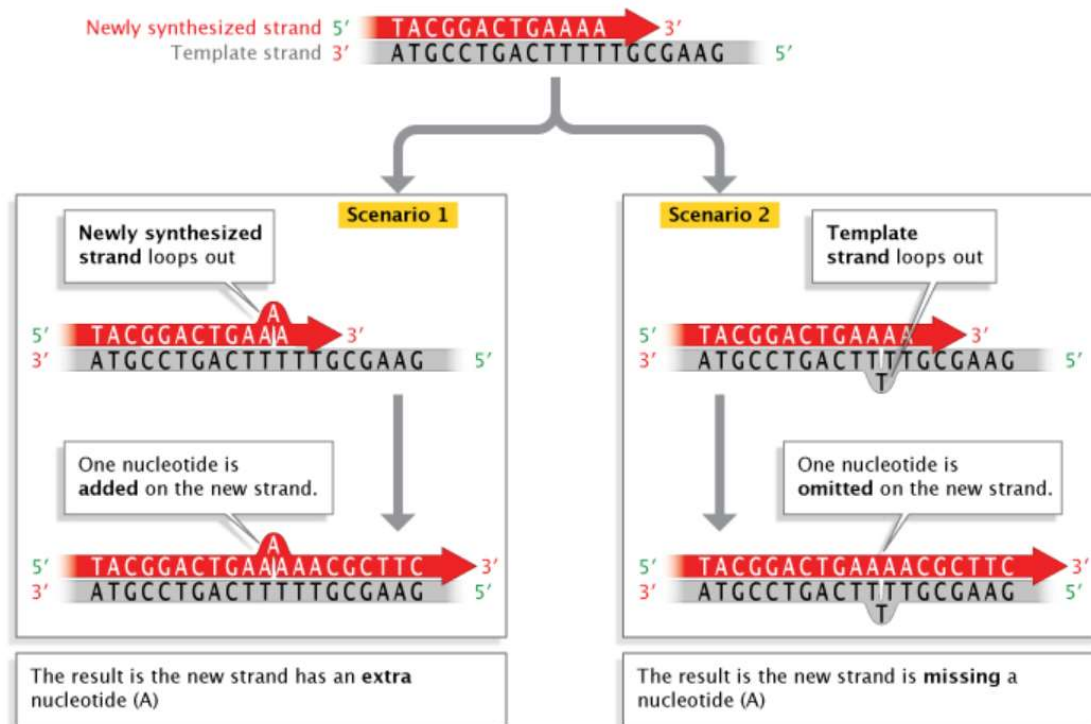
A valóságban egyetlen marker sem felel meg az összes kritériumnak, mindig az adott probléma dönti el, hogy melyiket használjuk. (Amiteye, 2021.) A molekuláris markerek általában olyan specifikus DNS-szekvenciákra utalnak, amelyek tükrözhetik az egyedek vagy populációk genomjának bizonyos különbségeit, és a DNS minta vizsgálatán keresztül közvetlenül felfedhetik a szervezetben lévő genetikai információkat. Más molekuláris markerekkel összehasonlítva a nagy variabilitású, kodominanciával és nagy polimorfizmussal jellemezhető

SSR markereket az egyik leghasznosabb genetikai markernek tekintik. A mikroszatellit régiókat használhatjuk nagy sűrűségű kapcsoltsági térképek elkészítéséhez, QTL-térképezéshez, genetikai diverzitás elemzéséhez, fajtaazonosításhoz és marker-asszisztált nemesítéshez. Másik előnye, hogy a fajok között nagymértékben átvihető SSR markereket széles körben alkalmazzák összehasonlító genetikai és taxonómiai kutatásokhoz. Ezenkívül számos tanulmány alapján arra következtethetünk, hogy a mikroszatellit szekvenciák a genomban hatással lehetnek a génszabályozásra, a transzlációra, a géncsendesítésre, az RNS-splicingra és a metabolikus aktivitásokra. (Yan, et al., 2022.)

A diplomamunkám során én is SSR markereket alkalmaztam. Az SSR a Simple Sequence Repeat kifejezés rövidítése, ami magyarul Szimpla Szekvencia Ismétlődéseket jelent. Az SSR markerek mikroszatellit régióra tervezett molekuláris markerek. A mikroszatellit régiók egy és hat bázispár közötti ismétlődések a genomban, az alapján csoportosíthatjuk őket, hogy hány bázispár ismétlődik:

- Dinukleotid (GT)₆ : GTGTGTGTGTGT
- Trinukleotid (GTC)₄ : GTCGTCGTCGTC
- Tetranukleotid (GTCA)₄ : GTCAGTCAGTCAGTCA
- Pentanukleotid (GTCAG)₄ : GTCAGGTCAGGTCAGGTCAG
- Hexanukleotid (GTCAGC)₄ : GTCAGCGTCAGCGTCAGCGTCAGC

Előnyük, hogy ezek a régiók a nem kódoló területeken fordulnak elő ezért, ha ismétlődési hosszuk megváltozik az jó eséllyel nem jelent szelekciós hátrányt, így fennmarad. Ebből kifolyólag ezekre a szekvenciákra tervezett molekuláris markerek kiválóan alkalmazhatóak egyedek elkülönítésére, mivel fajon belül az egyedek között különbséget mutathat az ismétlődés hossza, így az genotípusra jellemző lehet. A mikroszatellit régiók nagy variabilitást mutatnak nemzetségen, sőt fajon belül is, az ismétlődések száma gyakran változik. Ennek a jelenségnek a leggyakoribb oka a DNS-polimeráz „megcsúszása”, melyet a 11. ábra szemléltet. (Vieira, et al., 2016.)



11. ábra: DNS-polimeráz megcsúszása
(Forrás: (Pray, 2008.))

A replikáció során az új DNS szál szintézise nem folyamatos, a két szál időnként elválík, és a visszarendeződés során hurok képződhet:

(Scenario 1) Backward slippage: A szintetizált szálon lévő hurok miatt az új szálon eggyel több ismétlődő szakasz lesz.

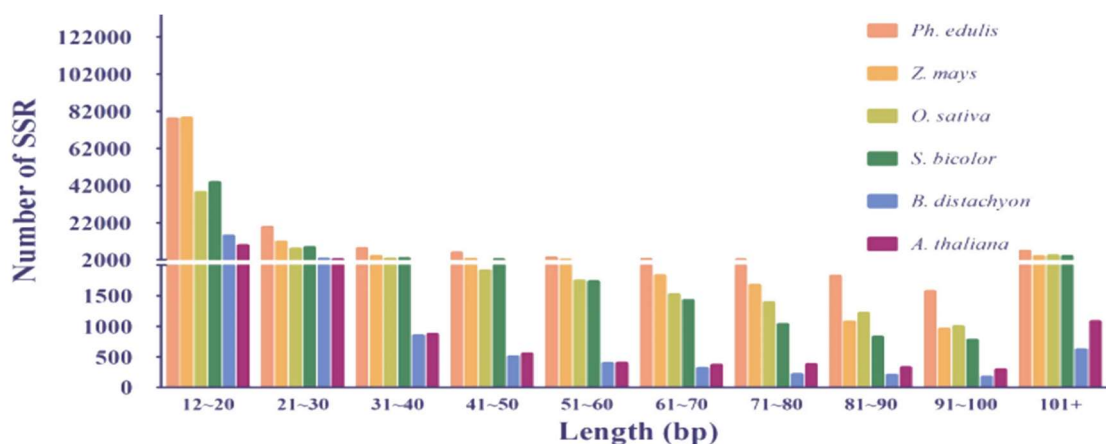
(Scenario 2) Forward slippage: A minta szálon alakul ki a hurok, a szintetizált szálon eggyel kevesebb ismétlődés lesz. (Pray, 2008.)

A mikroszatellit régiók fajon belül, néha nemzetségen belül is hasonló ismétlődő szakaszokat mutatnak. Ahhoz, hogy ezeknek a régióknak a hosszát vizsgálni tudjuk speciális primerekre van szükség, melyek az ismétlődő szakaszok végeire vannak tervezve, így PCR segítségével a megismerni kívánt régiók felamplifikálhatók és vizsgálhatók. Fontos a szekvencia kiválasztása, hogy a primer tényleg specifikus legyen és más genomi részekhez ne kötődjön. Egy ilyen speciális primerhez szükség van a mikroszatellit régiókat körülhatároló szekvencia ismeretére, melyet bizonyos esetekben megtalálhatunk publikációkban, de ha ilyen szekvencia nem áll rendelkezésre a primer elkészítése lehet költséges is. (Moniruzzaman, et al., 2016.) Az SSR markerek esetében a kiértékeléshez használhatunk agaróz gélelektroforézist, de az egyedek között gyakran csak egy, vagy két bázispár eltérés van az ismétlődő szakaszok hosszában, ezért

a kapilláris gélelektroforézis, vagy a poliakrilamid gélen való futtatás sokkal pontosabb eredményt ad.

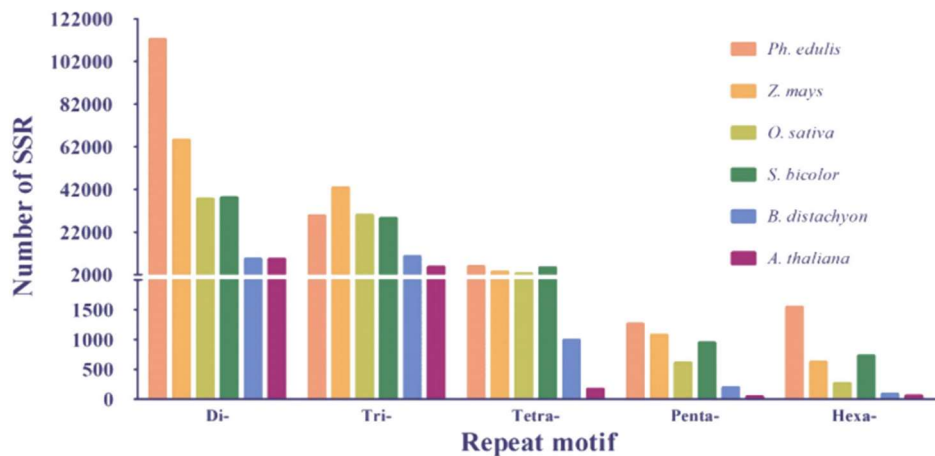
2.5.1. SSR markerek a bambuszban

A bambusz esetében a morfológiai bélyegek alapján történő azonosítás, és a taxonómia felállítása problémákba ütközik, mivel az egyik fontos és különleges jellemzője a ritka és előre nem látható virágzás bekövetkezése, ami akár 120 évig is eltarthat, ezért erősen korlátozott a friss szaporítóanyagok tanulmányozásának lehetősége. Másrészt, a bambusz jelenlegi morfológián alapuló taxonómiája, amely főként a vegetatív jellemzőktől függ, nem elég pontos ahhoz, hogy a fajok, illetve formák között egyértelmű különbséget állapítsunk meg, mert eltérések megfigyelhetők a bambusz szárában, levelében vagy rizómájában a különböző fejlődési szakaszokban vagy a különböző környezeti feltételek között is. Az azonosított bambuszfajok számának növekedésével a morfológiai taxonómián alapuló zavaros jelenségek, például a homonimák és szinonimák jelentek meg. A probléma megfelelő kezelése és a bambusz taxonómia segítése érdekében jelentős előrelépést jelentenek a molekuláris markerek, ezen belül is az SSR markerek használata. A 12-es, és 13-as ábrák jól mutatják, hogy a *Phyllostachys edulis* genomja rengeteg mikroszatellit régiót tartalmaz, ami még inkább alátámasztja a bambuszok esetében az SSR markerek alkalmazásának jelentőségét. A kutatás során hat növény genomjának mikroszatellit régióit vizsgálták: *Ph. edulis* (Mosobambusz), *Z. mays* (Kukorica), *O. sativa* (Rizs), *S. bicolor* (Cirok), *B. distachyon* (Szálkaperje), és *A. thaliana* (Lúdfű). (Hansheng, et al., 2015.)



12. ábra: A vizsgált növényekben található SSR markerek száma, hosszúságuk szerinti csoportosításban

(Forrás: (Hansheng, et al., 2015.))



13. ábra: A vizsgált növényekben található SSR markerek száma, az ismétlődő szekvenciák száma alapján csoportosítva
(Forrás: (Hansheng, et al., 2015.))

A nagy különbség a vizsgált növényekben található SSR markerek számában a genom méretére vezethető vissza, de a 14. ábrán látszik, hogy minden a kutatásban részt vevő növény esetében a genom nagy százalékát teszik ki a mikroszatellit régiók (75-88%), ezért mutatnak nagy polimorfizmust, és használhatóak fel széleskörűen .

Plant species	Genome size (Mb)	SSR/Mb	Identified SSRs			
			Single SSRs (2–6 bp repeat motif)		Compound SSRs	
			Number	%	Number	%
<i>Phyllostachys edulis</i>	2051.7	62.2	106,582	83.53	21,011	16.47
<i>Zea mays</i>	2066.4	52.1	94,683	87.88	13,059	12.12
<i>Oryza sativa</i>	374.5	165.5	49,505	79.88	12,472	20.12
<i>Sorghum bicolor</i>	738.5	91.1	57,016	84.70	10,295	15.30
<i>Brachypodium distachyon</i>	271.9	76.5	17,865	85.93	2,924	14.07
<i>Arabidopsis thaliana</i>	119.7	135.5	12,259	75.59	3,958	24.41

14. ábra: A vizsgált növényekben található SSR markerek százalékos aránya
(Forrás: (Hansheng, et al., 2015.))

Korábban a szekvenciaadatok hiánya miatt kevés SSR markert azonosítottak a bambuszokban, és azok nem mutattak elég polimorfizmust, ezért teljeskörű mikroszatellit elemzést végeztek a Mosobambusz (*Phyllostachys edulis*) genomján. Számos SSR-markert fejlesztettek ki a bambusz genetikai diverzitásának és filogenetikájának elemzésére, ami hasznos volt a bambusz genetikai fejlesztésében és taxonómiai vizsgálatában. A feltérképezett mikroszatellit markereket többek között arra használták, hogy minél több különbséget tárjanak fel 78 törzs között melyek a *Phyllostachys* nemzetségbe tartoznak, és nagy jelentőségűek, mivel a

kereskedelem 90%-át teszik ki. Az SSR markereknek köszönhetően sikeresen állítottak fel a 78 törzs között rokonsági viszonyokat. (Hansheng, et al., 2015.) Az ilyen jellegű kutatásoknak köszönhetően egyre több tudományos cikk jelenik meg, és nő a száma a publikált primereknek, melyek lehetővé teszik a mikroszatellit régiók vizsgálatát a bambuszokban. Sok esetben cél a *Phyllostachys* nemzetségen belül, olyan primerek kutatása, melyek polimorfizmust mutatnak. A 2. táblázatban látható primereket például *Phyllostachys pubescens*-nél alkalmazták sikeresen mikroszatellit régiók felamplifikálásra, és mindegyik átvihető volt hat másik *Phyllostachys* fajba is, melyet a 3. táblázat szemléltet. (Tang, et al., 2009.)

2. Táblázat: Mikroszatellit régiókra tervezett primerek *P. pubescens* bambuszban

Forrás: (Tang, et al., 2009.)

Primer	Forward Primer	Reverse Primer	Felamplifikált szakasz hossza
PBM014	GCCGTCCAAACGCTCCTT	CACCCATCCATCTTATGCTAT	294/244
PBM016	CCCACAGAAGGTGCGACTA	CCGCCGAGAACGTCTACAT	88
PBM018	GACGACGAGTGTAACGCTGAG	AGGATGATGCCGGTGAGG	285
PBM020	TCGCATCTAAACAACATC	GAGAAGAAGAAAGGAGGA	117
PBM022	AAAGATGTTGCCTTGTC	GTGCATGTCTATTCCCTC	146

3. Táblázat: Felamplifikált szakaszok hossza a vizsgált *Phyllostachys* fajoknál

Forrás: (Tang, et al., 2009.)

Primer	Felamplifikált szakasz hossza					
	<i>Ph. nidularia</i>	<i>Ph. atrovaginata</i>	<i>Ph. heteroclada</i>	<i>Ph. praecox</i>	<i>Ph. kwangsiensis</i>	<i>Ph. bambusoides</i>
PBM014	316/298/ 244	274/244	292/244	274/244	294/244	283/244
PBM016	86	88	104	126	88	94
PBM018	285	285	285	285	285	285
PBM020	117	117	117	117	117	117
PBM022	146	146	146	138	146	146

A diplomamunkám során használt primereket is publikálták már, és leírták az általuk felamplifikált ismétlődések hosszát különböző *Phyllostachys* fajokban. A 4. táblázat a publikációk eredményeit mutatja:

4. táblázat: Felhasznált primerek és jellemzőik
(Forrás: (Tang, et al., 2009.), (Jiang, et al., 2013.))

Primer Név	Mikroszatellit régió	Felamplifikált szakasz hossza (bp)	Vizsgált faj
PBM017	(CCT) ₈	237	<i>P. pubescens</i>
PBM017	(CCT) ₉	240	<i>P. bambusoides</i>
PBM017	(CCT) ₇	231	<i>P. nidularia</i>
PBM017	(CCT) ₉ /(CCT) ₇	242/230	<i>P. heteroclada</i>
PBM017	(CCT) ₉	242	<i>P. atrovaginata</i>
Phe100	(CTT) ₈	189-204	<i>P. edulis</i>
Phe141	(CGT) ₇	321-336	<i>P. edulis</i>
Phe167	(CCTG) ₇	151-163	<i>P. edulis</i>

A 2. és a 4. táblázatban bemutatott primerek segítségével genetikai diverzitás, illetve taxonómiai összefüggések vizsgálhatók, de vannak olyan SSR markerek a bambuszoknál, melyeket összefüggésbe hoztak bizonyos gazdaságilag jelentős tulajdonsággal. A *Phyllostachys* nemzetség a fás szárú bambuszokhoz tartozik, melyekre a hagyományos fakitermeléssel szemben megújuló erőforrásként tekintünk. A faképződéshez nélkülözhetetlen a lignin jelenléte, mely a másodlagos sejtfalak fő alkotóeleme. A lignin bioszintézisében több enzim vesz részt, mint például a fenilalanin ammónia-liáz, a cinnamát-4-hidroxiáz, vagy a peroxidáz. Kutatóknak sikerült olyan SSR markereket fejleszteni, melyek a peroxidáz géncsaládon belül polimorfizmust mutatnak a *Bambusoideae* hét nemzetségébe tartozó 34 állományában. Az ilyen fontos tulajdonsághoz kapcsolódó génekben azonosított polimorf SSR markerek nagyon hasznosak marker-asszisztált nemesítésben, és a funkcionális gének szabályozási mechanizmusainak tanulmányozásához különböző bambusz fajokban. (Yan, et al., 2022.)

2.6. Az SSR vizsgálatokhoz alkalmazható berendezések

A *Phyllostachys* nemzetség jól használható genetikai markereinek kutatásán többen is dolgoztunk, és bizonyos esetekben azonos fajon belül a két minta között a felamplifikált szakasz hosszában egy-egy primerrel eltérés volt kimutatható. Mivel a PCR elvégzése során, illetve a poliakrilamid gélen kapott eredmények kiértékelése közben előfordulhatnak hibák, az én célom a kutatásom során az volt, hogy ezekkel a primerekkel többször megismételve a mikroszatellit régiók vizsgálatát, a kapott eredményekkel megcáfoljam, vagy megerősítsem, hogy az ismétlődések hossza a vizsgált fajokon belül valóban eltérnek-e. A munkám során több berendezést is használtam, melyek segítenek az eredmények kiértékelésében.

2.6.1. NanoDrop készülék

A NanoDrop készüléket a DNS izolálása után alkalmazzák, a spektrofotometria segítségével képes a DNS tisztaságát, és koncentrációját meghatározni. Alapja, hogy a különböző anyagokhoz meghatározott energiaszintek tartoznak, melyekre jellemző egy adott elnyelt, vagy kibocsátott hullámhossz. A nukleinsavak esetében a 260 nm-en mért elnyelési értéket szokták vizsgálni. 230 és 320 nm között található a tiszta DNS elnyelési profilja, az ettől való eltérés szennyeződés jelenlétére utal, a DNS koncentráció pedig kiszámítható az elnyelés mértékéből. A DNS mintából elegendő 2 µl-t a gépre pipettázni. (Desjardins-Conklin, 2010.)

2.6.2. PCR készülék

A PCR, mely az angol Polymerase Chain Reaction rövidítése, magyarul Polimeráz-lánreakciót jelent, lehetővé teszi, hogy bármilyen eredetű DNS bizonyos szekvenciáját *in vitro* körülmények között, gyorsan az eredeti mennyiséghez képest több ezerszeresére felszaporítsunk. Maga a PCR készülék ciklusokat futtat le, és a ciklusok alatt a hőmérséklet változás hatására történik az amplifikáció. Minden egyes PCR ciklusban a DNS mennyisége a reakcióelegyben megduplázódik, azaz például 40 ciklus után 2^{40} -szerese az eredeti DNS mennyiségnek. (Lorenz, 2012.) Egy PCR ciklus több szakaszból áll:

1. Denaturáció

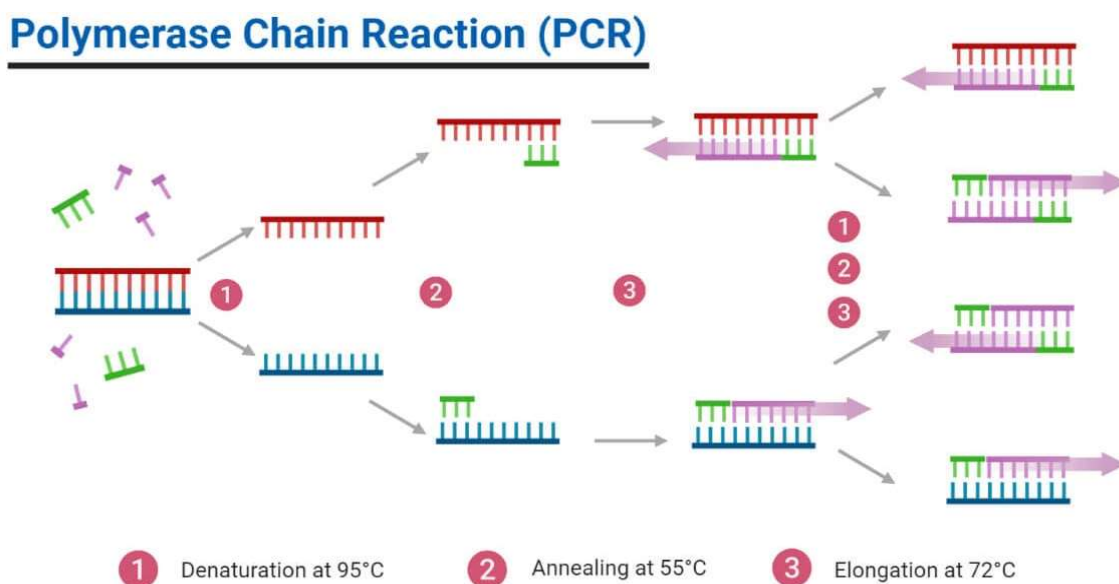
Ebben a szakaszban történik a denaturáció, a DNS szálak szétválasztása. Ehhez magas hőmérséklet szükséges, 90-95 °C. Ebben a lépésben szétválik egymástól a két szál és a DNS egyszálas lesz.

2. Primerek kötődése

Itt csökken a hőmérséklet 50 és 68 °C között ideális a primerek kötődéséhez. Mindegyik primernek más az optimális tapadási hőmérséklete, ez függ a hosszától, illetve a guanin, és citozin tartalmától.

3. Új szálak szintézise

A primerek tapadása után a Taq-polimeráz új szálakat szintetizál. A szintetizáláshoz a dNTP-eket használja fel és építi be egymás után a templát DNS szekvenciájához. A polimeráz működése 72 °C-on optimális (Garibyan-Avashia, 2013.) A 15. ábra szemlélteti a Polimeráz-lánreakció működését.



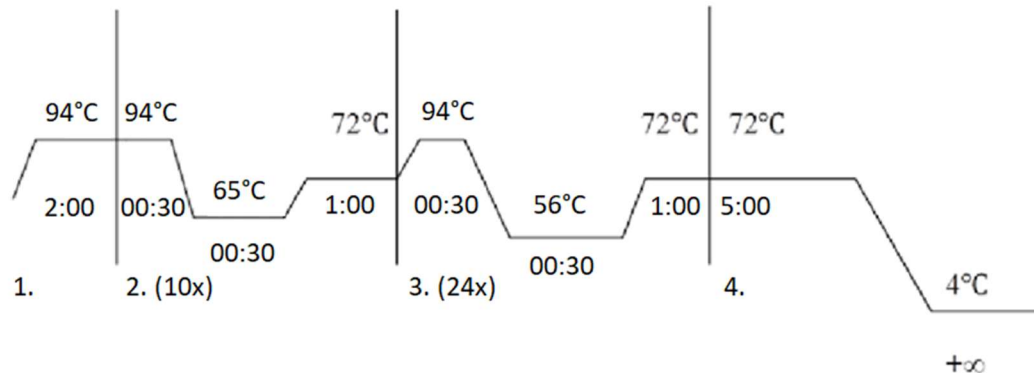
15. ábra: Polimeráz-lánreakció

(Forrás: (Aryal, 2023.))

A PCR készülék ciklus szakaszai manuálisan beállíthatók, így a használt primer tapadási hőmérsékletéhez igazíthatjuk a lefutást. Mi egyszerre 4 primerrel dolgoztunk, ezért a PCR készüléken a Touch Down programot választottuk, ahol a denaturációtól folyamatosan

csökkent a hőmérséklet a második szakasz hőmérsékletének eléréséig az 1-10 ciklusban, így nagyobb eséllyel kötődött minden primer a reakció közben. Ha az összes ciklus lefut a PCR készülék a mintákat 4 °C-on tartja, hogy ne történjen további tapadás, vagy DNS szintézis. A 16.ábrán látható az általunk használt beállítás.

Touch-Down PCR



16. ábra: Touch-Down PCR
(Forrás: Saját szerkesztés)

2.6.3. Agaróz gélelektroforézis

Az agaróz gélelektroforézis alapja, hogy a töltéssel rendelkező molekulák elektromos közegben az ellentétes töltésű elektróda felé haladnak. A tálca egyik oldalán pozitív, a másik oldalán pedig negatív katód található. A tálcát pufferrel töltik meg, és ebbe helyezik az agaróz gél. Az agaróz gélen zsebeket alakítanak ki, amelybe a vizsgálni kívánt DNS mintákat pipetázzák. A DNS mintákat a negatív oldalon töltjük be, és a pozitív irányba mozognak, az hogy milyen gyorsan tudnak a gélben haladni a DNS nagysága, hossza határozza meg. A DNS minták mellett egy molekuláris tömeg markert (meghatározott méretű szekvenciákat tartalmazó elegy) is futtatunk az agaróz gélen, melynek segítségével meg tudjuk határozni a felszaporított szekvenciák hosszát. Az agaróz gélelektroforézis eredménye UV-fény alatt válik láthatóvá, az agaróz gélhez kevert etídiumbromidnak köszönhetően. (Lee, et al., 2012.)

3. Anyag és módszer

3.1. Növényanyag

A labor munkám során három *Phyllostachys* faj: *P. rubromarginata*, *P. parvifolia* és *P. aureosulcata* mintával dolgoztam (5. táblázat). Mindegyik faj esetében két eltérő minta állt rendelkezésre, a *P. rubromarginata* fajoknál az volt a különbség, hogy az egyik minta egy virágzó szárról lett véve, a *P. parvifolia* minták között a gyűjtési helyben volt eltérés, egyiket a Gödöllői arborétumban, a másikat pedig Dr. Neményi András kertjében szedték, míg a *P. aureosulcata* faj esetében két különböző forma állt rendelkezésre.

5.táblázat: Vizsgált bambusz fajok listája

(Forrás: Saját szerkesztés)

Minta	Bambusz fajta	Gyűjtési hely
17/1	<i>P. rubromarginata</i>	MATE Botanikus kert
17/3	<i>P. rubromarginata</i> flowering stem	MATE Botanikus kert
17/9	<i>P. parvifolia</i>	MATE Botanikus kert
17/12	<i>P. parvifolia</i>	Dr. Neményi András kertje
17/13	<i>P. aureosulcata</i> forma <i>aureocaulis</i>	MATE Botanikus kert
17/28	<i>P. aureosulcata</i> forma <i>aureosulcata</i>	MATE Botanikus kert

3.2. Primerek

6. táblázat: A használt primerek listája

(Forrás: (Tang, et al., 2009.), (Jiang, et al., 2013.))

Név	Forward	Reverse
PBM017	TATGCCTCCAATAATCCG	AAGGCGTAGCCACCGAAT
Phe100	GACATTAGGCGAGGTTCCGG	GGGAGATGGACAGGTTTGCT
Phe141	AGGCCATAAGGAACTGCT	GCTTCCAAACCTCCCATC
Phe167	AACAGCGAAACCACAGACC	AGCAGGATGAGACGAGCC

3.3. Módszerek

3.3.1. DNS izolálás

A DNS izoláláshoz a Nucleospin Plant II protokolt használtuk.

1. 60 g levélmintát folyékony nitrogén segítségével mozsárban lisztszerű állagúra porítottunk, és Eppendorf csőbe töltöttük.
2. Hozzápipettáztunk 400 µl PL1 buffert, és 10 µl RNáz A oldatot. A keveréket 10 percig 65 °C-os vízfürdőbe helyeztük. A vízfürdő után 5 percig centrifugáltuk 13.000-es fordulatszámon, hogy a szilárd és a folyékony fázisok egymástól elváljanak.
3. Egy új gyűjtőcsőbe belehelyeztük a Nucleospin Filtert, és a centrifugálás után a felülúszót átpipettáztuk a filterre, és 2 percig centrifugáltuk 11.000-es fordulatszámon. Erre azért van szükség, hogy a DNS a filternek köszönhetően minél kevesebb szennyeződést tartalmazzon.
4. Előkészítettünk egy új 1,5 ml-es Eppendorf csövet, amibe átpipettáztuk a folyadékot. Hozzáadtunk 450 µl PC buffert és vortex-szel alaposan összekevertük.
5. Egy új 2 ml-es gyűjtőcsőbe előkészítettük a Nucleospin Plant II Column-t, mely a DNS megkötéséért felelős. A DNS-t két részletben pipettáztuk a csőbe, minden alkalommal maximum 700 µl-t, és minden alkalommal 1 percig 11.000-es fordulatszámon centrifugáltuk, majd az átfolyt folyadékot kiöntöttük.
6. Átmostuk a filtert, először 400 µl PW1 filtert pipettáztunk a csőbe, és 1 percig 11.000-es fordulatszámon centrifugáltuk, az átfolyt folyadékot kiöntöttük. Majd két lépésben PW2 buffert pipettáztunk a csőbe, először 700 µl-t, majd 200 µl-t. Első lépésben 1 percig 11.000-es fordulatszámon, második lépésben 2percig 11.000-es fordulatszámon centrifugáltuk. Minden alkalommal a túlfolyó részt kiöntöttük, a végén 10 percig hagytuk az oszlopot száradni.
7. A Nucleospin Plant II Column-t egy új gyűjtőcsőbe helyeztük és leoldottuk a DNS-t. 50 µl PE buffert adtunk hozzá, és 5 percig 65 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd 1 percig 11.000-es fordulatszámon centrifugáltuk. Ezt a lépést még egyszer megismételtük.
8. A DNS-t egy új csőbe helyeztük, feliratoztuk és NanoDrop segítségével megvizsgáltuk a minőségét.

3.3.2. PCR

A PCR első lépéseként elkészítettük a Master Mix-et. A Master Mix elkészítésekor mi 14 mintával számoltunk, ez azért szükséges, hogyha a pipettázás során valamilyen hibából kifolyólag kevesebb kerülne a keverékbe, akkor is biztosan elegendő legyen 12 mintához. A MasterMix összetevőit az 7.táblázatban foglaltam össze:

7. Táblázat: MasterMix összetevői

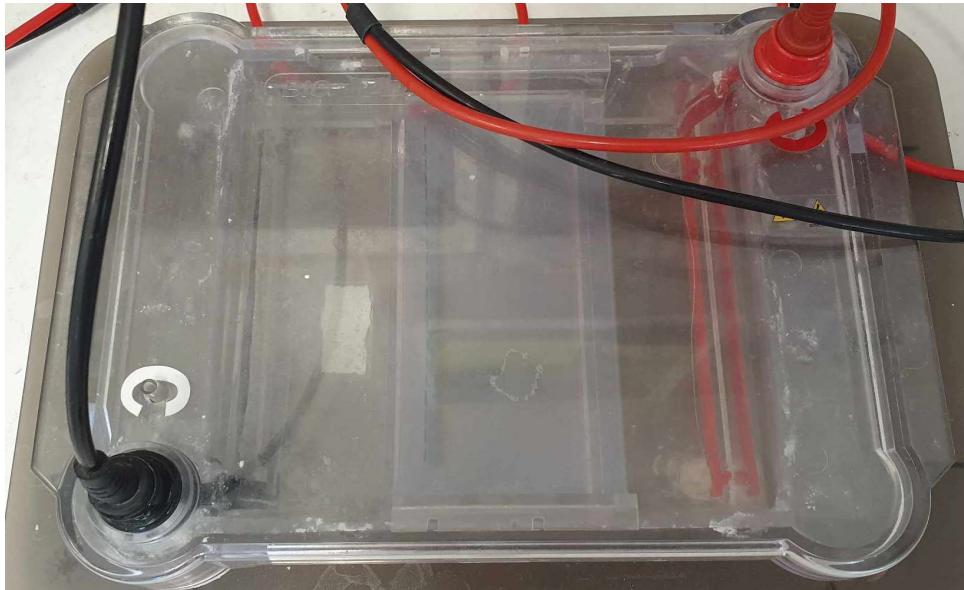
(Forrás: Saját szerkesztés)

Összetevők	Mennyiség 1 mintához (μl)	Mennyiség 14 mintához (μl)
Víz	4	56
MgCl ₂ (25mM)	0,45	6,3
Dream Taq Puffer	1	14
dNTP (2mM)	1	14
Forward Primer (100pM)	0,75	10,5
Reverse Primer (100pM)	0,75	10,5
Dream Taq-polimeráz (5U/ μl)	0,05	0,7

A MasterMix elkészítése közben végig jégen dolgoztunk, mivel a komponensek minősége szobahőmérsékleten, és többszöri kiolvasztás hatására romlik, különösen a Taq-polimeráz érzékeny, és ez negatív irányba befolyásolhatja a PCR eredményét. Összesen négy különböző MasterMixet állítottam össze a négy eltérő primerrel, majd mindegyikből 8 μl-t pipettáztam 12 PCR csőbe, és a különböző DNS mintákból 2 μl-t adtam hozzájuk. A DNS-mintákat előtte a NanoDrop alapján kapott eredmények segítségével 20 ng/μl koncentrációjúra hígítottam.

3.3.3. Agaróz gélelektroforézis

A mintákat megfuttattuk agaróz gélen a PCR elvégzése után, így ellenőriztük hogy a PCR sikeres volt-e. Ezen kívül a molekula tömeg marker segítségével meg tudtuk határozni, hogy a PCR során milyen hosszúságú szakaszok amplifikálódtak fel. A 17. ábrán egy futtató tálca látható.



17. ábra: Agaróz gélelektroforézishez használt futtató tálca
(Forrás: Saját kép)

A tálcába először 0,5 X-os TBE puffert töltöttünk. 5X-os TBE puffer készítése:

- 54 g Tris
- 27,5 g bórsav
- 20 ml 0,5 M EDTA (Etilén-diamin-tetraecetsav) (ph 8.0)

Az 5X-os TBE puffert hígítottuk: 100 ml 5X TBE puffer + 900 ml víz, majd a 0,5X-os pufferrel agaróz gél készítettünk. 1%-os agaróz gél készítése:

120 ml 0,5X-os TBE pufferhez hozzáadtunk 1,2 g agaróz port. A keveréket körülbelül 2 percig mikróban melegítettük, addig amíg az oldat átlátszóvá vált. Folyó víz alatt hűtöttük, majd 5 µl etídium-bromidot adtunk hozzá. Kitöltöttük tálcába és fésűt helyeztünk bele, hogy zsebeket alakítsunk ki a minták betöltéséhez. A minták mellett molekulatömeg markert is töltöttünk a zsebekbe, aminek segítségével a DNS minta hossza megközelítőleg megállapítható.

3.3.4. ALF Express

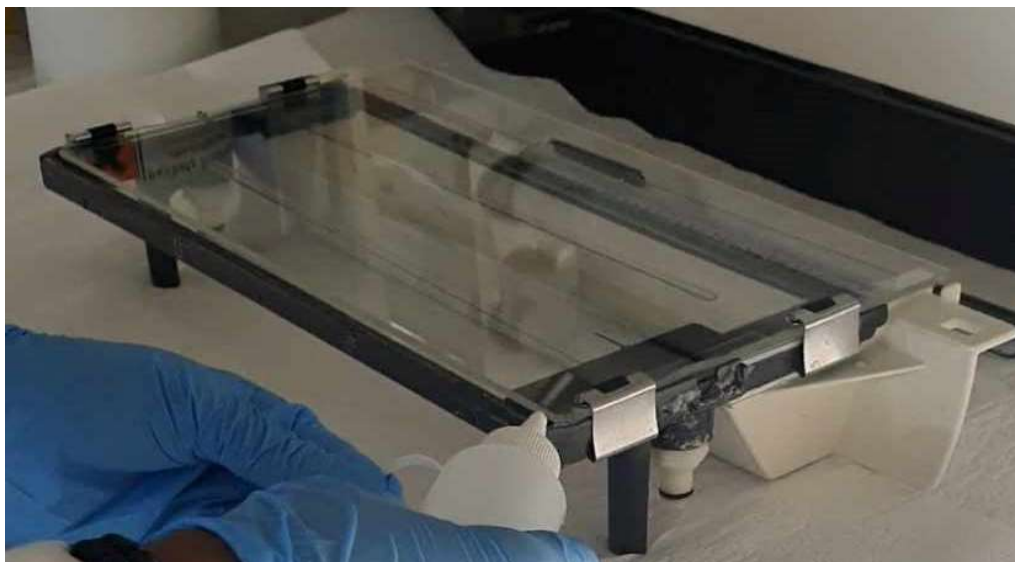
Az ALF expressz használatához először elő kell készíteni a Thermo Plate-et, melyet a poliakrilamid gél megszáradása után behelyezünk az ALF expressz készülékbe. A Thermo Plate egy kazettából áll, amelynek a két szélére egy-egy spacer, 0,5 mm vastag üvegcsíkot helyezünk. Ha a spacerok a helyükön vannak rákerül az üveglap, és mind a két végén rögzítjük. A spacerok segítségével a kazetta és az üveglap között kialakul egy 0,5mm vastag rés, ahova a poliakrilamid gél kell betölteni. A 18. ábrán a ThermoPlate látható.



18. ábra: ThermoPlate az üveglap és a spacerek behelyezése után
Forrás: Saját kép

Nagyon fontos, hogy az összes alkatrész alaposan el legyen mosva a használat előtt, mert a szennyeződések ronthatnak a kapott eredmény minőségén. Az utolsó elem a fésű, amit felülről illesztünk a kazetta, és az üveglap közé, hogy a poliakrilamid gélen kialakuljanak a zsebek. Az összeillesztés során végig kesztyűben dolgoztunk, mivel a poliakrilamid gél mutagén. A következő lépés a poliakrilamid gél elkészítése volt:

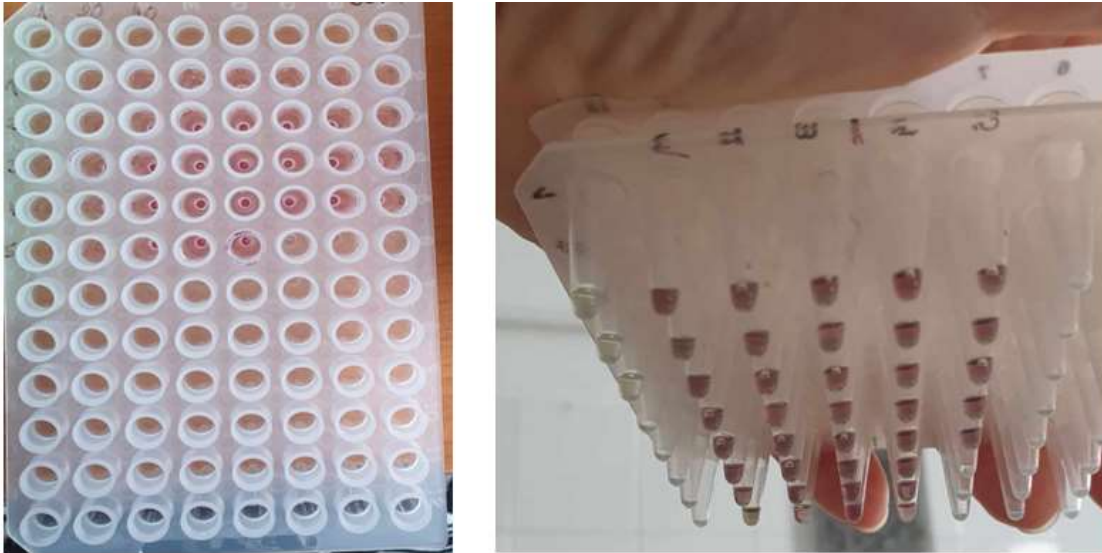
1. Kimértünk 0,0625 g APS (Ammónium-perszulfát) port, és 250 μ l steril vízzel elkevertük, amíg a por teljesen feloldódott.
2. Előkészítettünk 30 ml 6%-os poliakrilamid gélt és hozzáadtunk 30 μ l APS oldatot.
3. Utolsó lépésként az oldathoz adtunk 30 μ l TEMED (Tetrametil-etilén-diamin)-et, és alaposan összeráztuk a keveréket. A poliakrilamid gélt betöltöttük az összeszerelt ThermoPlate-be, majd a buborékokat eltávolítottuk egy vékony műanyag eszköz segítségével, melynek vége kampó alakú. Ahhoz, hogy a gél megszilárduljon 45 percen Utolsó lépésként az oldathoz adtunk 30 μ l TEMED (Tetrametil-etilén-diamin)-et, és alaposan összeráztuk a keveréket. A poliakrilamid gélt betöltöttük az összeszerelt ThermoPlate-be, majd a buborékokat eltávolítottuk egy vékony műanyag eszköz segítségével, melynek vége kampó alakú. Ahhoz, hogy a gél megszilárduljon 45 percen keresztül UV-lámpával világítottuk meg. A 19. ábra a poliakrilamid gél betöltését mutatja.



19. ábra: Poliakrilamid gél betöltés
(Forrás: Saját kép)

A poliakrilamid gélen csak azokat a mintákat futtattuk meg, melyeknél az agaróz gélelektroforézis elvégzése után pozitív eredményt kaptuk, tehát a PCR futtatása során adott hosszúságú szakaszok felamplifikálódtak. Ezeket a mintákat előkészítettük a poliakrilamid gélen való futtatáshoz. Egy futás alatt 39 zseb áll rendelkezésre, ebből 36 helyre a DNS minták kerülnek betöltésre, és a maradék három zsebben a Külső Standard található. A Külső Standard különböző hosszúságú DNS szakaszok keveréke, melyek viszonyítási alapként szolgálnak a kiértékelés során. Az ismert hosszúságú DNS szekvenciákhoz képest az ALF Express a minták elemzése során pontosabban meg tudja határozni a felamplifikált szakaszok hosszát. A Külső Standard olyan bázispár hosszúságú mintákat tartalmaz, melyeket a gélelektroforézis során kapott eredmények alapján körülbelül várunk. Mivel mi négy különböző primerrel dolgoztunk, ezért a kapott szekvenciák hossza igen eltérő volt, így a Külső Standardet is ennek megfelelően állítottuk össze. Hat különböző bázispár hosszúságú mintát használtunk: 70, 95, 150, 300, 350, és 503. Következő lépésként a Belső Standardet készítettük el. A Belső Standard is segíti az analízist, ezt a Külső Standarddel ellentétben nem külön zsebekbe töltjük az analízis során, hanem minden DNS mintához hozzákeverjük. Fontos eltérés még, hogy itt nem olyan hosszúságú DNS szakaszokkal dolgozunk melyek a mi mintáinkkal körülbelül megegyeznek, hanem olyan szekvenciákat választunk, melyek közé várhatóan esni fog a mi általunk használt minták hosszúsága. Mi 75 és 503 bázispár hosszú mintákkal dolgoztunk, amikhez Cresol redet adtunk. A Cresol Red segítségével válnak a DNS minták láthatóvá a poliakrilamid gélen való futtatás közben. A következő lépésben egy speciális

platebe töltöttük a Külső Standardet, háromszor 10 μ l-t az első sorba. Az alatta lévő sorokban 4 μ l steril víz, és 3 μ l belső standard került, végül pedig a 36 darab DNS mintából 2 μ l-t pipettáztunk a keverékbe. A 20. ábrán látszik a speciális plate, ami a géltre való felvitel alatt segít, mivel könnyebben nyomon követhető, hogy melyik mintát kell a soron következő zsebbe pipettázni.



20. ábra: Speciális plate a minták előkészítéséhez
(Forrás: Saját kép)

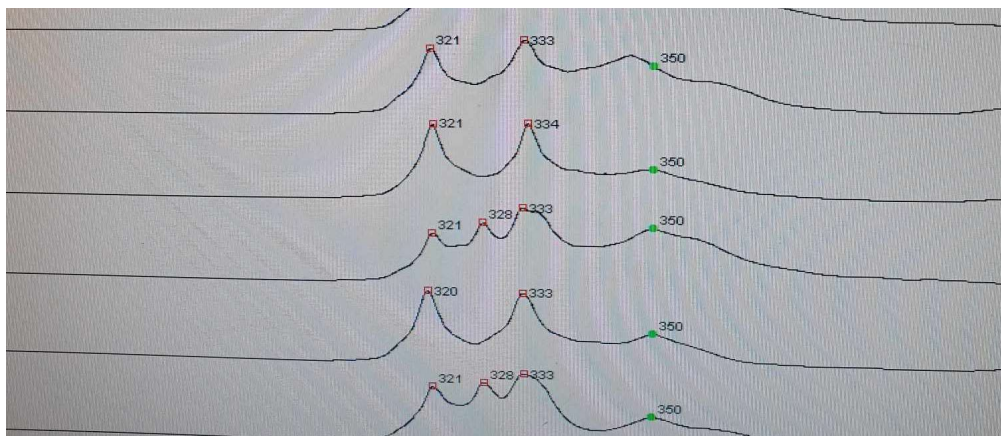
Miután a poliakrilamid gél megszilárdult, a ThermoPlate-et függőlegesen az Alf Express készülékbe helyeztük. Az agaróz gélelektroforézishez hasonlóan itt is található puffer, mi 1X-es puffert használtunk, mivel ezzel készült a poliakrilamid gél is. A ThermoPlate kazetta részében víz található, melyet a készülék 55°C-on áramoltat működés közben. Az ALF Express működésének lényege, hogy a poliakrilamid gélen kialakított „zsebekbe” töltjük az előkészített DNS mintákat. A forward primer, amellyel korábban a PCR-t végeztük Cy-5 fluoreszcens festékkel van megjelölve. A vörös lézertényit a jelölt nukleinsav minták gerjesztik, a készülék így tudja leolvasni a minta hosszúságát. Minden zsebnek külön detektora van. Mikor a gélt behelyezzük a gépbe, kivesszük a fésűt, és injekciós tű segítségével egyesével átmoszuk pufferrel a zsebeket. Először előfutást indítunk, melynek során felmelegszik a víz, és az esetleges szennyeződés ki tud futni a gélből. Ez körülbelül 15 percet vesz igénybe. Az előkészített nukleinsav mintákat PCR készülékben 95°C-on 4 percig denaturáltuk, majd jégen tároltuk. A már felmelegedett gépbe, az előfutás után egyesével töltjük meg a zsebeket a mintával. Minden minta után pufferrel át kell öblíteni a pipettát. A program futásának ideje

függ a vizsgált szekvenciák hosszától, nálunk körülbelül két órát vett igénybe. A 21. ábrán az ALF Express készülék látható a ThermoPlate behelyezése után.



21. ábra: ALF Express készülék
(Forrás: Saját kép)

A poliakrilamid gélen való futtatás során folyamatosan nyomon követhető, hogy milyen bázispár hosszúságú szekvenciák lettek már detektálva, amikor elérjük a leghosszabb használt Külső Standerdet a futást leállíthatjuk. Ahhoz, hogy a gép pontosan meg tudja adni a szekvenciák hosszát, manuálisan meg kell adni a Külső, és a Belső Standerdek hosszát, és hogy hol találhatóak. A többi csúcsot pedig a viszonyítási alapoknak köszönhetően a készülék képes leolvasni, és megadni a DNS szakaszok hosszát. A 22. ábrán az ALF Express leolvasási felülete látható.



22. ábra: ALF Express leolvasási felülete
(Forrás: Saját kép)

4. Eredmények

4.1. DNS izolálás

A DNS izolálása sikeres volt, eredményeit az 8. és a 9. táblázat mutatja.

8. Táblázat: 1. DNS izolálás eredménye

(Forrás: Saját szerkesztés)

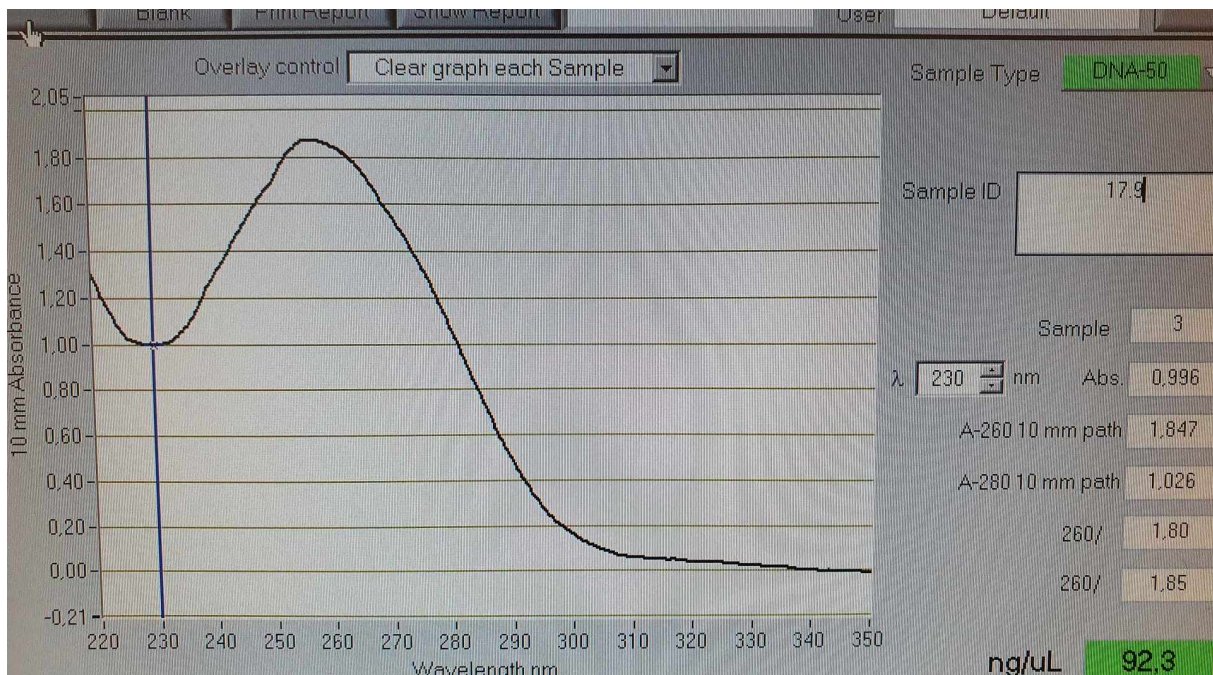
Minta	Bambusz faj	Koncentráció(ng/μl)
17/1	<i>P. rubromarginata</i>	44,6
17/3	<i>P. rubromarginata flowering stem</i>	22,1
17/9	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	48,6
17/12	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	31,7
17/13	<i>P. aureosulcata forma aureocaulis</i>	23,8
17/28	<i>P. aureosulcata forma aureosulcata</i>	23

9. Táblázat: 2. DNS izolálás eredménye

(Forrás: Saját szerkesztés)

Minta	Bambusz faj	Koncentráció(ng/μl)
17/1	<i>P. rubromarginata</i>	41,9
17/3	<i>P. rubromarginata flowering stem</i>	29,7
17/9	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	92,3
17/12	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	36,8
17/13	<i>P. aureosulcata forma aureocaulis</i>	26,2
17/28	<i>P. aureosulcata forma aureosulcata</i>	28,8

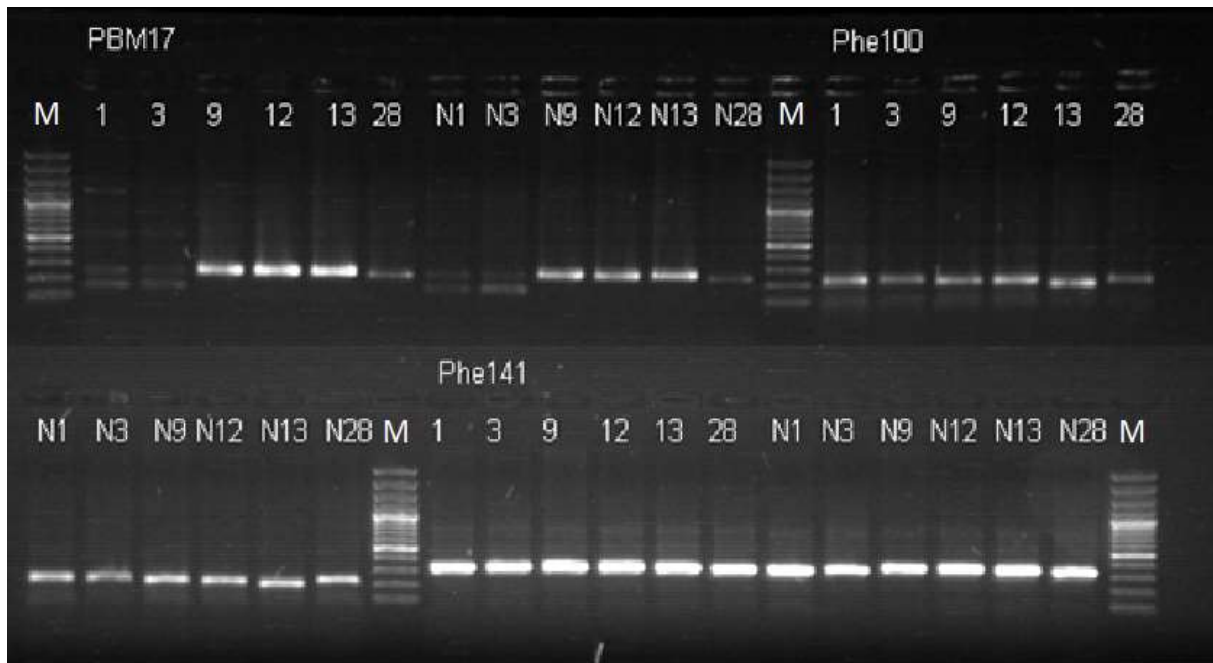
A DNS minták koncentrációját NanoDrop készülék segítségével állapítottam meg, a 23. ábrán a 17/9-es *P. parvifolia* DNS-ének eredménye látható az izolálás után.



23. ábra: NanoDrop eredmény a 17/9-es mintánál
(Forrás: Saját kép)

4.2. PCR eredmények

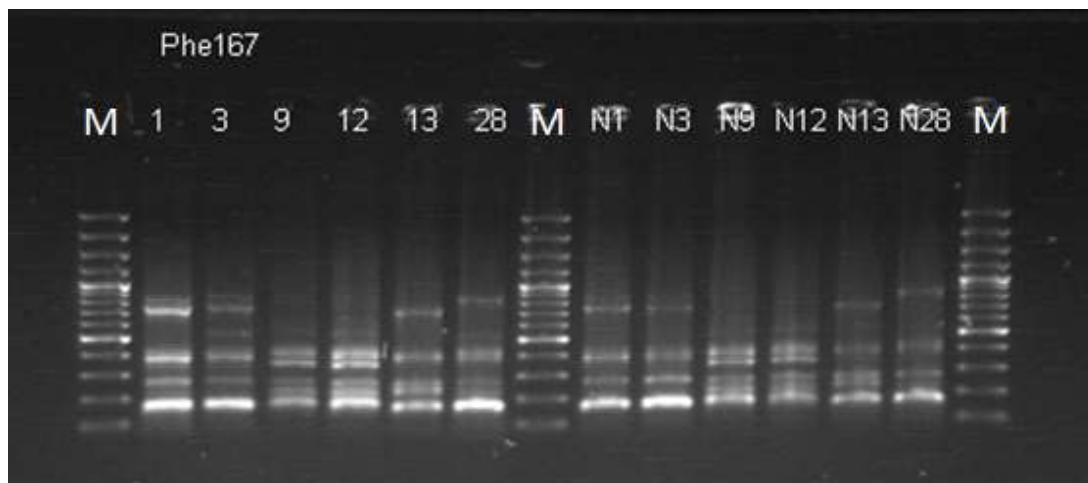
A PCR minták agaróz gélelektroforézise után megállapítottuk, hogy az összes mintánál sikerült a várt hosszúságú szekvenciák felszaporítása, melyet a molekula tömeg marker segítségével hozzávetőlegesen meg is tudtunk állapítani. A 24-es ábra az agaróz gélképeket mutatja a PBM17-es, Phe100-as, és a Phe 141-es primerekkel. A Phe167-es primerrel kapott PCR eredmény, több ismétlés után sem csak az irodalomban leírt fragmentum méretet eredményezte, hanem több nem várt szakasz amplifikációját is. Az eredmény a 25. ábrán látható. Feltételeztük, hogy a primerek esetleg nem csak a tervezett szakaszokhoz kötöttek ki, ezért több rövidebb szakasz is felszaporozódott. A mintákat a poliakrilamid gélen is lefuttattuk.



24. ábra: Agaróz gélelektroforézis eredmény a PBM17-es, Phe100-as, és a Phe 141-es primerekkel

M : Molekuláris tömegmarker: 100 bp plus, 1: *P. rubromarginata* (1. DNS izolálás), 3: *P. rubromarginata flowering stem* (1. DNS izolálás), 9: *P. parvifolia*, MATE arborétum (1. DNS izolálás), 12: *P. parvifolia*, Dr. Neményi András kert (1. DNS izolálás), 13: *P. aureosulcata forma aureocaulis* (1. DNS izolálás), 28: *P. aureosulcata forma aureosulcata* (1. DNS izolálás), N1: *P. rubromarginata* (2. DNS izolálás), N3: *P. rubromarginata flowering stem* (2. DNS izolálás), N9: *P. parvifolia*, MATE arborétum (2. DNS izolálás), N12: *P. parvifolia*, Dr. Neményi András kert (2. DNS izolálás), N13: *P. aureosulcata forma aureocaulis* (2. DNS izolálás), N28: *P. aureosulcata forma aureosulcata* (2. DNS izolálás)

(Forrás: Saját kép)



25. ábra: Agaróz gélelektroforézis eredmény a Phe167-es primerrel

M : Molekuláris tömegmarker: 100 bp plus, 1: *P. rubromarginata* (1. DNS izolálás), 3: *P. rubromarginata flowering stem* (1. DNS izolálás), 9: *P. parvifolia*, MATE arborétum (1. DNS izolálás), 12: *P. parvifolia*, Dr. Neményi András kert (1. DNS izolálás), 13: *P. aureosulcata forma aureocaulis* (1. DNS izolálás), 28: *P. aureosulcata forma aureosulcata* (1. DNS izolálás), N1: *P. rubromarginata* (2. DNS izolálás), N3: *P. rubromarginata flowering stem* (2. DNS izolálás), N9: *P. parvifolia*, MATE arborétum (2. DNS izolálás), N12: *P. parvifolia*, Dr. Neményi András kert (2. DNS izolálás), N13: *P. aureosulcata forma aureocaulis* (2. DNS izolálás), N28: *P. aureosulcata forma aureosulcata* (2. DNS izolálás)

(Forrás: Saját kép)

A 10. táblázatban összefoglaltam a PCR elvégzése után kapott eredményeket. A táblázatban szerepel a felszaporított szakasz hossza, valamint, hogy már agaróz gélen is megállapítható-e a primer polimorfizmusa.

10. táblázat: Hozzávetőleges eredmények a PCR elvégzése után

(Forrás: Saját szerkesztés)

Primer	Felszaporított szakasz hossza (bázispár)	Eltérést mutat a felszaporított szakaszok hossza a minták között?
PBM17	100-200 és 200-300 között	igen
Phe100	~200	igen, minimálisat
Phe141	300-400	nem megállapítható
Phe167	nem megállapítható	igen

4.3. ALF eredmények

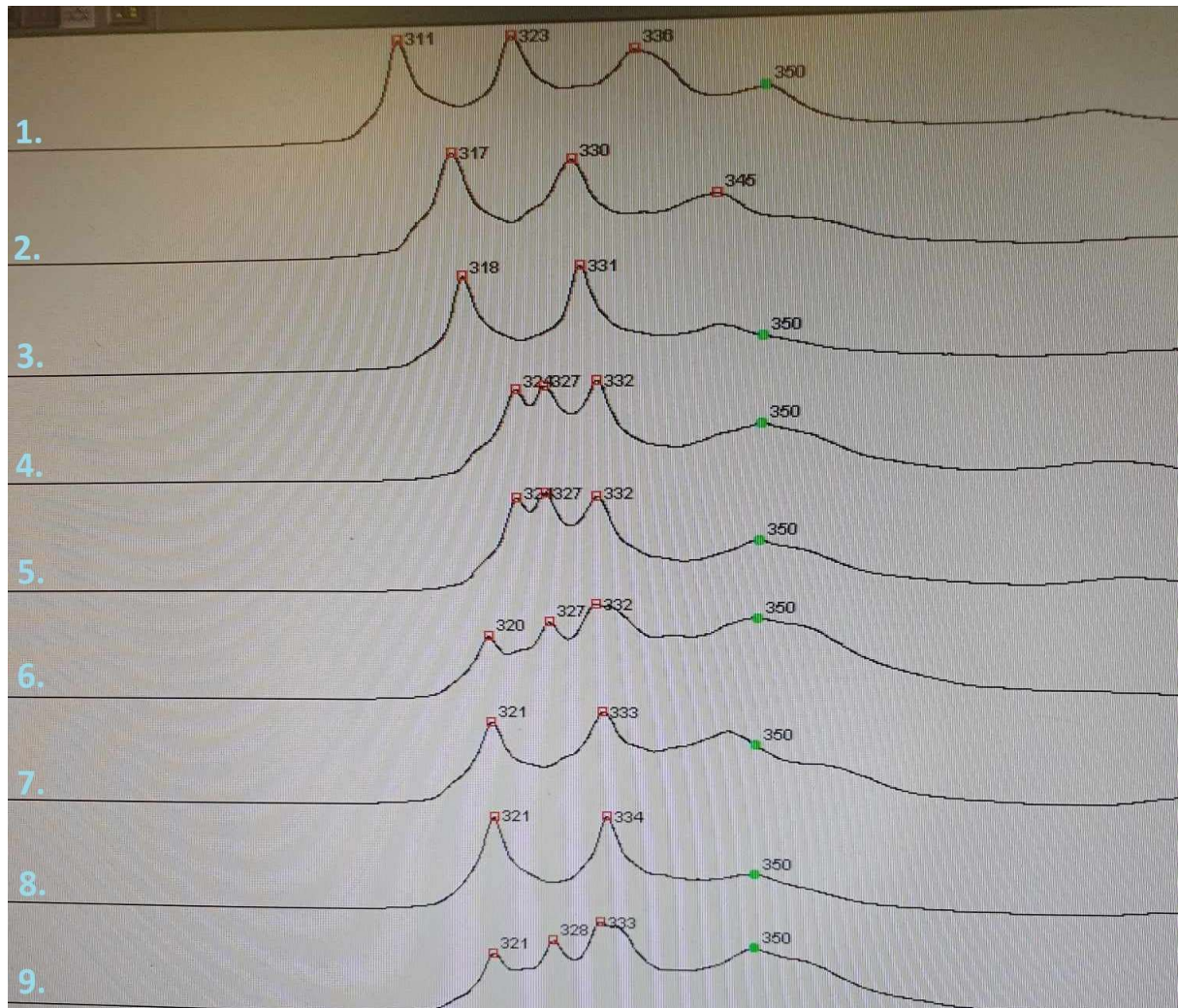
Az agaróz gélen megállapítható fragmentumok pontos méretének meghatározásához az ALF készüléket eredményesen alkalmaztuk. A poliakrilamid gélen való futtatás után az összes mintánál egyértelműen leolvasható eredményeket kaptunk (11. táblázat), és az ismételt futtatások is egyezést mutattak.

11. Táblázat: Felamplifikált szakaszok hossza a vizsgált primerekkel

(Forrás: Saját szerkesztés)

Primer	DNS minta	Bambusz faj	Bázispár hossz
PBM017	17/1	<i>P. rubromarginata</i>	140; 235; 246
PBM017	17/3	<i>P. rubromarginata flowering stem</i>	140; 235; 246
PBM017	17/9	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	235; 242
PBM017	17/12	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	235; 242
PBM017	17/13	<i>P. aureosulcata forma aureocaulis</i>	241; 249
PBM017	17/28	<i>P. aureosulcata forma aureosulcata</i>	227; 242
Phe100	17/1	<i>P. rubromarginata</i>	203; 206
Phe100	17/3	<i>P. rubromarginata flowering stem</i>	203; 206
Phe100	17/9	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	197
Phe100	17/12	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	197
Phe100	17/13	<i>P. aureosulcata forma aureocaulis</i>	179
Phe100	17/28	<i>P. aureosulcata forma aureosulcata</i>	200; 206
Phe141	17/1	<i>P. rubromarginata</i>	317; 331
Phe141	17/3	<i>P. rubromarginata flowering stem</i>	317; 331
Phe141	17/9	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	324; 327; 332
Phe141	17/12	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	324; 327; 332
Phe141	17/13	<i>P. aureosulcata forma aureocaulis</i>	317; 324; 331
Phe141	17/28	<i>P. aureosulcata forma aureosulcata</i>	322; 336
Phe167	17/1	<i>P. rubromarginata</i>	149
Phe167	17/3	<i>P. rubromarginata flowering stem</i>	149
Phe167	17/9	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	156; 163
Phe167	17/12	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	156; 163
Phe167	17/13	<i>P. aureosulcata forma aureocaulis</i>	149
Phe167	17/28	<i>P. aureosulcata forma aureosulcata</i>	149

A Phe167-es primernél az agaróz gélnél tapasztalt bizonytalan fragmentum szám már a poliakrimamid gélen nem volt látható, csak az irodalmi adatok alapján is várt fragmentumokat detektálta a készülék. A 26. ábrán a Phe141-es primer ALF Express eredménye látható.



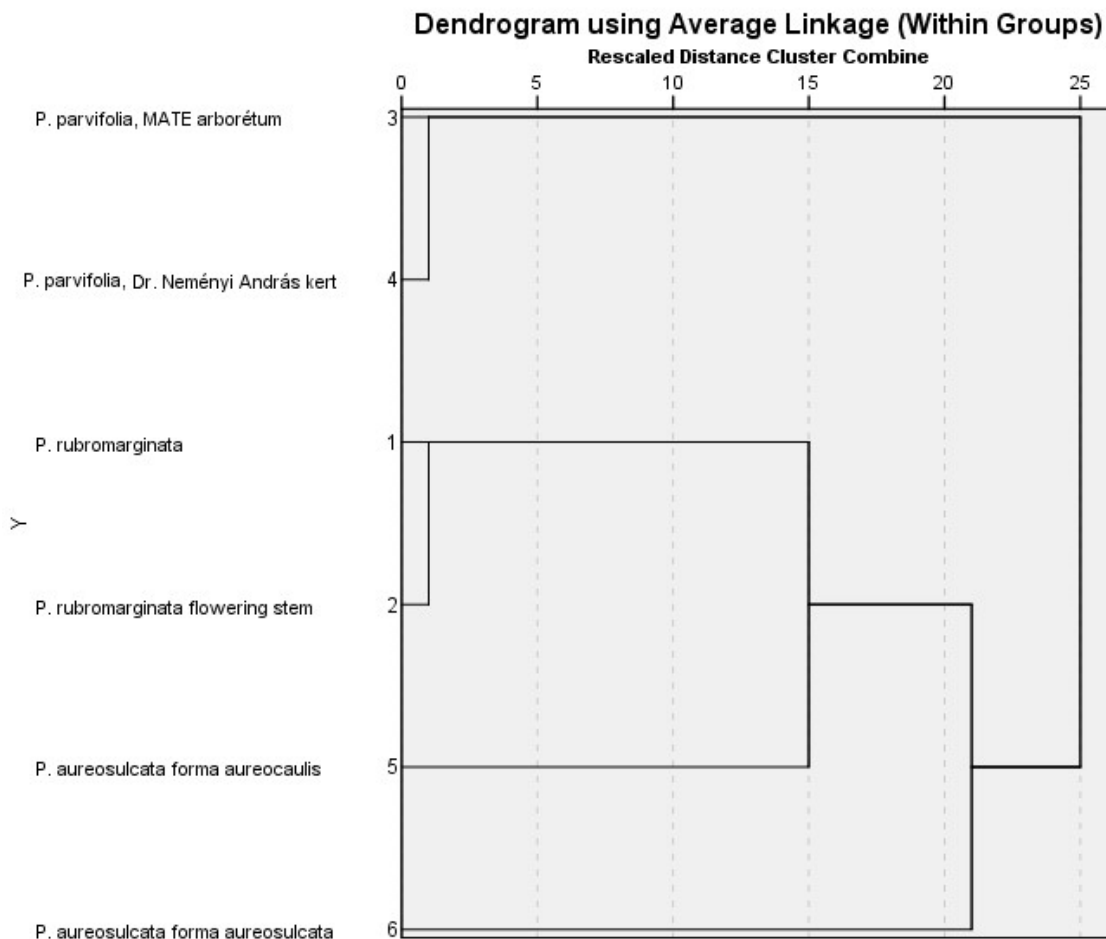
26. ábra: ALF Express eredménye

Minta: *P. aureosulcata forma aureosulcata* (1. DNS izolálás), 2. Minta: *P. rubromarginata* (2. DNS izolálás), 3. Minta: *P. rubromarginata flowering stem* (2. DNS izolálás), 4. Minta: *P. parvifolia*, MATE arborétum (2. DNS izolálás), 5. Minta: *P. parvifolia*, Dr. Neményi András kert (2. DNS izolálás), 6. Minta: *P. aureosulcata forma aureocaulis* (2. DNS izolálás), 7. Minta: *P. aureosulcata forma aureosulcata* (2. DNS izolálás), 8. Minta: *P. rubromarginata* (1. DNS izolálás), 9. Minta: *P. aureosulcata forma aureocaulis* (1. DNS izolálás)

(Forrás: Saját kép)

4.4. Dendrogram

A PBM017, Phe100, Phe141 és Phe167 primerekkel vizsgált mikroszatellit régiók alapján felállítottuk a vizsgált bambusz fajok közötti rokonsági viszonyokat, melyet a 27. ábrán látható dendrogram szemléltet.



27. ábra: Dendrogram
(Forrás: Saját kép)

4.5. Eredmények kiértékelése

Az irodalomban nem találtunk az általunk vizsgált fajokra SSR adatokat, csak rokon fajokra. Az ALF készülékkel meghatározott fragmentum méretek az irodalomban leírt rokon fajoknál meghatározott mérettartománnyal megegyeztek. Az összehasonlítás a 12. táblázatban látható.

12. Táblázat: Irodalmi adatok összehasonlítása a kapott eredményekkel

Forrás: Saját szerkesztés

Forrás	Bambusz faj	PBM017	Phe100	Phe141	Phe167
Saját eredmény	<i>P. rubromarginata</i>	140; 235; 246	203; 206	317; 331	149
	<i>P. rubromarginata</i> <i>flowering stem</i>	140; 235; 246	203; 206	317; 331	149
	<i>P. parvifolia</i> , MATE arborétum	235; 242	197	324; 327; 331	156; 163
	<i>P. parvifolia</i> , Dr. Neményi András kert	235; 242	197	324; 327; 331	156; 163
	<i>P. aureosulcata forma</i> <i>aureocaulis</i>	242; 249	179	317; 324; 331	149
	<i>P. aureosulcata forma</i> <i>aureosulcata</i>	227; 242	200; 206	321; 336	149
Irodalmi adat (Jiang, et al., 2013.)	<i>Ph. edulis</i>	n.a.	189-204	321-336	151-163
Irodalmi adat (Tang, et al., 2009.)	<i>P. pubescens</i>	237	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>P. bambusoides</i>	240	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>P. nidularia</i>	231	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>P. heteroclada</i>	242/230	n.a.	n.a.	n.a.
	<i>P. atrovaginata</i>	242	n.a.	n.a.	n.a.

17/1-es *P. rubromarginata*, és a 17/3-as *P. rubromarginata* virágzó száráról vett minták között a különböző primerekkel vizsgálva nem találtunk olyat, amely eltérő hosszúságú szekvenciákat

amplifikált fel. Ez azt jelenti, hogy ezt a mikroszatellit régiót vizsgálva a két genotíusból vett DNS nem mutat eltérést.

A 17/9-es *P. parvifolia* a Gödöllői botanikus kertben, a 17/12-es *P. parvifolia* pedig Dr. Neményi András kertjében került begyűjtésre. A négy vizsgált mikroszatellit szakasz itt sem mutatott eltérést.

A 17/13-as *P. aureosulcata forma aureocaulis* és a 17/28-as *P. aureosulcata forma aureosulcata* között a PBM017, Phe100 és a Phe167-es primerek eltérést mutatnak, ezek használatával a két forma molekuláris módszerekkel egymástól elkülöníthető.

5. Következtetések és javaslatok

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy az irodalomban (Jiang, et al., 2013., Tang, et al., 2009.) rokon *Phyllostachys* fajokra leírt SSR markerek az általunk vizsgált genotípusokra is alkalmazhatóak. A kapott eredmények azonos mérettartományba estek, így ezek a markerek más a MATE botanikus kertjében megtalálható *Phyllostachys* fajoknál is alkalmazhatóak.

A dendrogram is alátámasztja, hogy a fajták jól elkülöníthető csoportba kerültek, így a fajták megkülönböztetésére az SSR markerek alkalmasak. Valamint azt is mutatták, hogy a fenotípusos bélyegek alapján nehezen megkülönböztethető fajtaváltozatokat DNS szinten is elkülöníthetjük, mint azt a *P. aureosulcata* fajtánál is tapasztaltuk, ahol az alkalmazott SSR markerekkel sikerült a *P. aureosulcata* fajtánál a két fajtaváltozatot elkülöníteni. Az egyes változatok sokszor csak egy-egy fenotípusos tulajdonságban különböznek egymástól, például szárszín, így érdemes lehet az adott SSR régiót vizsgálni azért, hogy az adott tulajdonságot meghatározó gént vagy annak szabályozásában részt vevő DNS szakaszt azonosítani lehessen. Ezért javasolt lenne a *P. aureosulcata* két formájánál a különbséget mutató markereknél az adott lókuszt szekvencia szintű vizsgálatát elvégezni.

A Phe167-es markert is mindenképp tovább kéne vizsgálni, hogy megállapíthassuk miért mutatott az agaróz gél több felszaporodott fragmentumot, míg az ALF Express készülék már csak az irodalomban is tapasztalt méreteket detektálta. A detektálás eredménye akkor keletkezik, ha a Cy-5 fluoreszcens festéssel megjelölt primer betapad. Ezért feltételezhető, hogy a nem jelölt reverz primer több helyen is tudott kötődni, de a jelölt forward csak a várt helyeken. Így az ALF készülék már csak a helyes fragmentumokat detektálta.

6. Összefoglalás

A bambusz, ezen belül a *Phyllostachys* nemzetség termesztése, kereskedelme és hasznosítása világszerte nagy jelentőséggel bír. Legfőbb pozitív tulajdonsága, hogy a hagyományos fakitermeléssel szemben környezetbarát alternatívának számít, gyors növekedése, magas terméshozama, és kiváló regenerációs képessége miatt. Felhasználása nagyon sokoldalú, alkalmazzák bútorkészítésben, papírgyártásban, építkezéseken, illetve a bambuszrügy fontos élelmiszerként szolgál több Ázsiai országban is. Ezen sajátosságainak köszönhetően a bambusz termesztése, és kutatása kiemelkedően fontos.

A bambusz morfológiai bélyegekre épülő taxonómiája nem elég jól meghatározott ahhoz, hogy a fajok, illetve formák között egyértelmű különbségtételre alkalmas legyen. Ezt nehezíti, hogy a különböző fejlődési szakaszokban és a környezeti hatások következtében eltérés mutatkozhat a bambusz szárában, levelében vagy rizómájában. A probléma megoldásában nagy előrelépést jelentenek a molekuláris markerek, ezen belül is az SSR markerek használata. A mikroszatellit régiókra tervezett molekuláris markerek a fajok, illetve formák elkülönítésére remekül használhatóak, mivel az ismétlődések hossza genotípusra jellemző lehet. Ezen kívül vannak olyan SSR markerek, melyek gazdaságilag jelentős tulajdonságokkal is összefüggésbe hozhatók, például faképződés. Az ilyen mikroszatellit régiók a marker-asszisztált nemesítésben fontos szerepet játszanak.

A kutatási eredmények alapján, a használt SSR primerek alkalmazhatóak az általunk vizsgált genotípusokra is, illetve egyezést mutatnak az irodalomban (Tang, et al., 2009., Jiang, et al., 2013.) rokon *Phyllostachys* fajoknál leírt mikroszatellit régiókkal. A PBM017, Phe100, Phe141 primerek a fajok között polimorfizmust mutattak, alkalmazásukkal az egyedek DNS szinten elkülöníthetőek. Az alkalmazott SSR markerek tehát a *Phyllostachys* nemzetség kutatásában hasznosnak bizonyultak, érdemes velük a MATE gyűjteményében található többi *Phyllostachys* genotípust is megvizsgálni. Valamint a markerek és egyes tulajdonságok közötti esetleges kapcsoltságokat is keresni.

7. Irodalomjegyzék

- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2008) „Advances in molecular marker techniques and their applications in Plant Science.” *Plant Cell Reports*: 27: 617–631.
- Amiteye S. (2021) „Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding.” *Heliyon*: 7(1):e08093.
- Aryal S. (2023) „PCR- Definition, Principle, Enzymes, Steps, Types, Uses.” *Biochemistry*.
- Calderón, Cleofé E, Soderstrom R. T. (1980) *The genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American Continent : keys and comments*. Smithsonian Institution Press.
- Desjardins, Conklin P., Conklin D. (2010) „NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids.” *Journal of Visualized Experiments*: (45): 2565.
- Dlamini L. C., Fakudze S., Makombe G. G., Muse S., Zhu J. (2022) „Bamboo as a valuable resource and its utilization in historical and modern-day China.” *Bioresources* 17(1): 1926-1938.
- Garibyan L., Nidhi A. (2013) „Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR).” *The Journal of Investigative Dermatology*: 133(3): e6.
- Hansheng Z., Li Y., Zhenhua P., Huayu S., Xianghua Y., Yongfeng L., Lili D., Lili W., Zhimin G. (2015) „Developing genome-wide microsatellite markers of bamboo and their applications on molecular marker assisted taxonomy for accessions in the genus *Phyllostachys*.” *Scientific Reports*: 5(1):8018.
- Jiang W-X., Zhang W-Y., Ding Y-L. (2013) „Development of polymorphic microsatellite markers for *Phyllostachys edulis* (Poaceae), an important bamboo species in China.” *Applications in Plant Sciences*: 1(7): apps.1200012.
- Kiss J., Kiss M. (2021) *A bambusz szára*. <<https://www.bambusz.hu/a-bambusz-szara/>>.
- Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu Ch-Y.; Kim Y. H. (2012) „Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments.” *The Journal of Visualized Experiments*: (62): 3923.

- Lessard G., Chouinard A. (1980) *Bamboo research in Asia*. Kanada: International Development Research Centre.
- Li X-L, Lin R-S, Fung H-L, Qi Z-X, Song W-Q, Chen R-Y. (2001) „Chromosome numbers of some caespitose bamboos native in or introduced to China.” *Acta Phytotaxonomica Sinica*: 39:433–442.
- Liese W., Michael K. (2015) *Bamboo The Plant and its Uses*. Springer.
- Lobovikov M., Paudel S., Piazza M., Ren H., Wu, J. (2007) *World Bamboo Resources: A Thematic Study Prepared in the Framework of the Global Forest Resources Assessment 2005*. Róma : FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
- Lorenz T. C. (2012) „Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies.” *Journal of Visualized Experiments*: (63): 3998.
- Moniruzzaman M., Khatun R., Yaakob Z., Khan M. S., Mintoo A. A. (2016) „Development of Microsatellites: A Powerful Genetic Marker.” *The Agriculturists - A Scientific Journal of Krishi Foundation*: 13(1):152.
- Mridushree B., Smritikana D., Subhadeep B., Sukanya Ch., Amartya S., Touhidur R., Sonali D., Prasun B., Malay D. (2021) „Genomic insights into growth and development of bamboos: what have we learnt and what more to discover?” *Trees*: Volume 35, pages 1771–1791.
- Nautiyal S., Nautiyal D. P., Mishra A. (2008) „Bamboo propagation by branch cuttings: A farmer’s friendly technology for mass clonal multiplication.” *National Symposium on Intensive Forest Farming: The State of the Art*: Pp 49.
- Pray L. A. (2008) „DNA Replication and Causes of Mutation.” *Nature Education*: 1(1):214.
- Rao A.N., Dhanarajan G., Sastry G. B. (1987) „Bamboo propagation by branch cuttings: A farmer’s friendly technology for mass clonal multiplication.” *National Symposium in Intensive Forest Farming: The State of the Art*: Pp. 49.
- Recht C., Wetterwald M.F. (1992) *Bamboos*. Portland, Oregon : Timber Press.

- Tang D-Q., Lu J., Fang W., Zhang S. (2009) „Development, characterization and utilization of GenBank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species.” *Molecular Breeding*: 25(2): 299-311.
- Tihanyi Gy., Kósa G. (1998) *Bambuszok és Díszfüvek Képeskönyve*. Budapest: Kertek 2000.
- Vieira M. L. C., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. de F. (2016) „Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful.” *Genetics and Molecular Biology*: 39(3): 312–328.
- Yan L., Xiaoyan X., Guangzhu L., Chenglei Z., Kebin Y., Xiaohu F., Yongfeng L., Zhimin G. (2022) „Comprehensive Analyses of Simple Sequence Repeat (SSR) in Bamboo Genomes and Development of SSR Markers with Peroxidase Genes.” *Genes (Basel)*: 13(9): 1518.
- Zhang Y. X., Shi Y. J., Zhou Q. D., Ma L. S., Yao J. (2021) *Illustrated Flora of Bambusoideae in China Volume 1*. Szingapúr: Springer.
- Zhang Y. X., Shi Y. J., Zhou Q. D., Ma L. S., Yao J. (2022) *Illustrated Flora of Bambusoideae Volume 2*. Szingapúr: Springer.

8. Táblázatok és ábrák jegyzéke

8.1. A diplomadolgozatban szereplő ábrák

1. ábra: Bambusz felhasználási területei	5
2. ábra: A különböző rizómák felépítése	7
3. ábra: <i>Phyllostachys aureosulcata</i> virágzatának keresztmetszete és felépítése	8
4. ábra: <i>Phyllostachys aureosulcata</i> kalászkájának felépítése	8
5. ábra: Bambusz dugványok vágásának módja	10
6. ábra: Bambusz szár földbe fektetése	11
7. ábra: Rizóma feldarabolása.....	12
8. ábra: Az <i>Arundinariinae</i> altörzshöz tartozó néhány nemzetség ágainak jellegzetes fejlődése	13
9. ábra(balról jobbra): <i>Phyllostachys nigra</i> , <i>Phyllostachys Bambusoides 'Tanakae'</i> és <i>Phyllostachys vivax 'Huangwenzhu inversa'</i> szárai.....	14
10. ábra: A <i>Bambusoideae</i> alcsaládba tartozó nemzetségek ploid szintjük szerinti felosztása és elterjedése	15
11. ábra: DNS-polimeráz megcsúsúzása	18
12. ábra: A vizsgált növényekben található SSR markerek száma, hosszúságuk szerinti csoportosításban	19
13. ábra: A vizsgált növényekben található SSR markerek száma, az ismétlődő szekvenciák száma alapján csoportosítva	20
14. ábra: A vizsgált növényekben található SSR markerek százalékos aránya	20
15. ábra: Polimeráz-lánreakció.....	24
16. ábra: Touch-Down PCR	25
17. ábra: Agaróz gélelektroforézishez használt futtató tálca	29
18. ábra: ThermoPlate az üveglap és a spacerok behelyezése után	30
19. ábra: Poliakrilamid gél betöltés	31
20. ábra: Speciális plate a minták előkészítéséhez	32
21. ábra: ALF Express készülék.....	33
22. ábra: ALF Express leolvasási felülete	33
23. ábra: NanoDrop eredmény a 17/9-es mintánál.....	35

24. ábra: Agaróz gélelektroforézis eredmény a PBM17-es, Phe100-as, és a Phe 141-es primerekkel	36
25. ábra: Agaróz gélelektroforézis eredmény a Phe167-es primerrel.....	37
26. ábra: ALF Express eredménye	39
27. ábra: Dendogram	40

8.2. A diplomadolgozatban szereplő táblázatok

1. táblázat: A bambusz fajok felhasználásának főbb területei	4
2. táblázat: Mikroszatellit régiókra tervezett primerek <i>P.pubescens</i> bambuszban	21
3. táblázat: Felamplifikált szakaszok hossza a vizsgált <i>Phyllostachys</i> fajoknál	21
4. táblázat: Felhasznált primerek és jellemzőik.....	22
5. táblázat: Vizsgált bambusz fajok listája	26
6. táblázat: A használt primerek listája.....	26
7. táblázat: MasterMix összetevői	28
8. táblázat: 1. DNS izolálás eredménye	35
9. táblázat: 2. DNS izolálás eredménye	35
10. táblázat: Hozzávetőleges eredmények a PCR elvégzése után	38
11. táblázat: Felamplifikált szakaszok hossza a vizsgált primerekkel... Hiba! A könyvjelző nem létezik.	
12. táblázat: Irodalmi adatok összehasonlítása a kapott eredményekkel	43