

SZAKDOLGOZAT

ZSIROS NOÉMI

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Növénygenetikai és növénynevelési - szakirányú

továbbképzés Szak

**ÉTKEZÉSI NAPRAFORGÓ APAVONALAK NAPRAFORGÓ-
PERONOSZPÓRÁVAL SZEMBENI
REZISZTENCIANEMESÍTÉSE**

Belső konzulens: Dr. Veres Anikó

egyetemi docens

Külső konzulens: -

Készítette: Zsiros Noémi

IVK8QO

levelező tagozat

Intézet/Tanszék: Genetika és Genomika Tanszék

Gödöllő

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és célkitűzések	3
1.1. Bevezetés.....	3
1.2. Célkitűzések	5
2. Szakirodalmi áttekintés	6
2.1. A napraforgó növény.....	6
2.2. A napraforgó termesztés története és jelentősége.....	8
2.2.1. Napraforgó fajtahasználat Magyarországon.....	9
2.3. A napraforgó-peronoszpóra.....	9
2.3.1. A kórokozó felfedezése és jelentősége.....	9
2.3.2. A napraforgó peronoszpóra patotípusok meghatározása.....	10
2.3.3. A napraforgó-peronoszpóra gazdanövényköre és ökológiai igényei.....	10
2.3.4. A napraforgó-peronoszpóra tünetei.....	11
2.3.5. Napraforgó-peronoszpóra elleni védekezés.....	12
2.4. Növénynemesítés.....	13
2.4.1. Napraforgó nemesítés.....	13
2.4.2. Az étkezési napraforgó nemesítés kihívásai.....	14
2.5. Az étkezési napraforgó nemesítésének története és jelenlegi helyzete munkahelyemen	15
2.5.1. Étkezési napraforgó nemesítésben elért friss eredményeink	16
2.6. Hímsteril napraforgó nemesítési felhasználása	16
2.6.1. Gibberellinsav	16
3. Vizsgálatok módszerei	18
3.1. Steril növény létrehozása új vonal indításhoz, génbeépítéshez	18
3.1.1. Napraforgó gibberellines (GA3) kezelése	18
3.1.1.1. GA3 oldat elkészítésének menete:.....	18
3.1.1.2. A napraforgó csillagbimbó kezelése GA3 oldattal:.....	18
3.1.2. A napraforgó kasztrálása	19
3.2. A rezisztenciagén beépítés sikerességét ellenőrző vizsgálati módszerek.....	21
3.2.1. <i>Pl</i> gén jelenétének kimutatása PCR vizsgálattal	21
3.2.1.1. Levélmintagyűjtés PCR vizsgálathoz.....	21
3.2.1.2. DNS kivonása növényből módosított CTAB módszerrel.....	22
3.2.1.3. <i>Pl6</i> gén kimutatása növényi DNS-ből	23
3.2.1.4. <i>Pl8</i> gén gén kimutatása növényi DNS-ből.....	23
3.2.2. Napraforgó-peronoszpóra ellenállóság felmérésre irányuló provokációs kísérlet	24
3.2.2.1. Napraforgó peronoszpórával fertőzött növény részek gyűjtése és tárolása.....	24
3.2.2.2. Laboratóriumi teendők a fertőzött növényi részekkel	25

3.2.2.3. Provokációs kísérlet beállítása	25
4. Eredmények és értékelésük	28
4.1. Új vonal indítások és génbeépítések sikerességének értékelése gibberellin és kasztrálás alkalmazásának tükrében.....	28
4.2. A rezisztenciagén beépítés sikerességét ellenőrző vizsgálatok eredményei	30
4.2.1. <i>Pl6</i> és <i>Pl8</i> rezisztencia gén detektálására elvégzett PCR vizsgálatok eredménye.....	30
4.2.2. Feltételezhetően fals pozitív eredményt adó <i>Pl6</i> minták provokációs tesztjének kiértékelése.....	35
5. Következtetések és értékelések.....	38
6. Összefoglalás	40
7. Köszönetnyilvánítás.....	42
8. Irodalmi jegyzék	43
9. Mellékletek.....	49
10. Hallgatói nyilatkozat	50
11. Konzulensi nyilatkozat.....	51

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. Bevezetés

Az olajnövények sorában előkelő helyet elfoglaló napraforgó a kapás kultúrák közül utolsóként hódított teret a szántóföldi növénytermesztésben (Zsiros 2015). A napjainkra jelentős gazdasági mutatókkal bíró olajnövényt a 16. századi Európában és a 17. század közepén Magyarországon még csak dísnövényként tartották számon (http1).

Hazai viszonyokat tekintve a napraforgó igen meghatározó szerepkört tölt be szántóföldi növénytermesztésünkben, az utóbbi években vetésterülete 700 000 hektár környéki. A növekedés a növény jó alkalmazkodó képességének, szárazságtűrésének és sokoldalú felhasználhatóságának köszönhető.

Az állományokban súlyos károkat okozhatnak a gombás megbetegedések, ezért a betegségekkel szembeni védelemnek fontos szerepe van a termesztés során (Békési 2012; Bán et al. 2016).

A napraforgó egyik legveszélyesebb betegsége a napraforgó-peronoszpóra, melynek kórokozója a *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese et de Toni. (Zsiros 2015), mely jelentős, akár 100%-os termés kiesést is előidézhet a napraforgó állományban (http1, Gascuel et al. 2015). Magyarországon 2010-ig a betegségnek összesen öt változata volt ismert (Virányi et al. 2015), de a kórokozó rendkívüli változékonysága és az egyoldalú csávázószer használat miatt olyan új rasszok jelentek meg (Rudolf et al. 2011; Bán et al. 2014a, c), melyek képesek voltak megbetegíteni a korábban ellenálló növényfajtákat/hibrideket és a mefenoxam hatóanyagú csávázószerrel szemben toleranciát/rezisztenciát mutattak (Virányi és Spring 2011).

A köztermesztésben használt EU listás étkezési napraforgó hibridek az új patotípusokkal, vagy a peronoszpórával szemben semmilyen ellenállósággal nem rendelkeznek (Szekrényes 2023 -szóbeli). Ez, továbbá a csapadékos tavasz, a nem megfelelő vetésváltás és gyomszabályozás, valamint a kórokozó mefenoxam hatóanyaggal szembeni ellenállósága mind kedvező környezeti feltételnek bizonyul, és elősegíti az új változatok országos szintű terjedését.

A napraforgó-peronoszpóra veszélyessége leginkább nagyfokú genetikai változékonyságában rejlik (Bán et al. 2016). Az ellene való védekezés első és legfontosabb eleme a megelőzés (http2).

A vetőmagon együttesen alkalmazott genetikai és kémiai védelmet a megfelelő agrotechnikával (csíramentes talajállapot fenntartása, vetésváltás betartása, optimálisan

megválasztott vetésidő, gazdanövény gyomok irtása) kiegészítve csökkenthetjük a kórokozó új változatainak kialakulási veszélyét, miközben segítjük a rezisztencia források hosszútávú megőrzését és fenntartását (http1, http2).

A leghatékonyabb megoldásnak azonban a fertőzést előidéző patotípusok elleni rezisztencianemesítés tekinthető. A modern napraforgó-nemesítés célkitűzései közé tartozik a génállomány bővítésével új nemesítési módszerek és technikák alkalmazása, molekuláris markerekre alapozott szelekciós eljárások, hatékony és széles körű vonal- és hibridtesztelés, fajtakísérletezés úgy, hogy szem előtt tartjuk a még kedvezőbb agronómiai tulajdonságokra (szár, gyökér, tányér), betegségekre (ezen belül elsősorban peronoszpóra, szklerotínia és szádor), valamint a herbicid rezisztenciára való nemesítést.

A napraforgó-peronoszpórával szemben az ellenállóságot az ún. *Pl* gének biztosítják a hibridekben (Bán et al. 2016). Az 1990-es évek végén a *Plasmopara halstedii* populációban kialakult mefenoxam rezisztencia a vetőmag előállítókat a *Pl*-géneket (*Pl6*, *Pl7*, *Pl8*) tartalmazó vonalak felhasználásával ellenálló hibridek előállítására sarkallta (Virányi et al. 2015).

Az étkezési napraforgó előnyös táplálkozás-élettani tulajdonságai következtében termesztésének jelentősége folyamatosan nő (Szabó et al. 2009). A különböző piacok eltérő igényeket támasztanak, így az étkezési napraforgó nemesítés külön trendet képvisel a napraforgó piacon. A növény sokoldalúságát kihasználva, de a piaci elvárásokat szem előtt tartva az étkezési napraforgó nemesítésben a magas minőségre és a több betegséggel szembeni rezisztenciára kell helyezni a hangsúlyt (Feng et al. 2022).

Mivel a hagyományos védekezési módszerek már nem voltak kielégítőek a napraforgó-peronoszpórával szemben (Zsiros 2015), a rezisztencia gén beépítését követően saját anyagainkat többféle kísérletnek és vizsgálatnak vetjük alá, mielőtt teszthibrid keresztezésbe vonnánk őket, kiemelt hangsúlyt fektetve a napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztencia vizsgálatokra.

Nemesítői munkánk célja, a kereskedelmi tevékenységünkhöz szükséges árualapanyag hosszútávú biztosítása saját, peronoszpóra rezisztens étkezési napraforgó hibridekkel.

1.2. Célkitűzések

Munkahelyemen nemesítési asszisztensként az étkezési napraforgó nemesítésen belül az apavonalakkal foglalkozom. Nemesítési programunk egyik fő iránya a napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztencianemesítés, melyet hagyományos keresztezési módszerekkel végzünk.

Dolgozatomat a rezisztencia génforrások általunk alkalmazott vonalakba történő beépítés és a beépítést követő detektálás módszereiről írtam, mellyel célunk a megfelelő rezisztenciával rendelkező apavonalak (restorerek) előállítás és kiválogatása a későbbi hibridkeresztevésekhez.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A napraforgó növény

A napraforgó, tudományos nevén *Helianthus annuus* L., egynyári, egylaki, kétszikű, lágyszárú növény, napjaink egyik legjelentősebb olajnövénye. Az *Asteraceae* család tagja $2n = 34$ kromoszómaszámmal rendelkezik. Becsült genommérete 3000 Mbp (Kolkman et al. 2007).

Hasznosulása az emberi szervezetben 98 %. Magas a fehérje- és rosttartalma, jelentős D- és E-vitamin forrás ([http4](#), [http5](#), [http6](#)), valamint értékes zöldsakarmány és zöldtrágyanövény is ([http7](#)).

A fajtától függően a napraforgó 80-120 nap alatt éri el az érettséget, és magot termel ([http8](#)).

Jól fejlett, mélyre hatoló főgyökérből, és arról sűrűn szerteágazó oldalgyökerekből áll gyökérrendszere (1. ábra), melynek kialakulása függ a talaj típusától, annak víz és tápanyag ellátottságától. ([http9](#)). A gyökértömeg jelentős része a talaj felső 40-70 cm-ben található.

A lassú kezdeti fejlődésű kultúrnövény végső magasságát teljes virágzásban éri el, mely elérheti a 3-4 méteres magasságot is. Szivacsos állományú béllal kitöltött szára felálló, egyenes és hengeres (1. ábra); mely a vegetációs idő során megvastagszik, érés idején pedig elfásodva megkeményedik. A szár teljes felületét, és a levelek színi, valamint fonáki részét serteszörök borítják. Változatos leveleiről általánosságban az mondható el, hogy szélesek, hosszúkásak, szív alakúak és szórt állásúak. Utolsó levelei a szár tetején fészekpikellyé alakulnak át, melyek a kiszélesedő virágzati tengelyt (vacok) veszik körül ([http8](#); [http9](#)).

Fészekvirágzata, az úgynevezett tányér a méhek és rovarok számára is vonzó, több száz, sárga színű virágból tevődik össze. Átmérője pár cm-től akár 40cm-ig terjedhet. A vacokban a rovarok csalogatására szolgáló, elsőként nyíló, meddő, nyelvű virágokat és egymás után nyíló, hímnős csöves virágokat találunk (1. ábra).

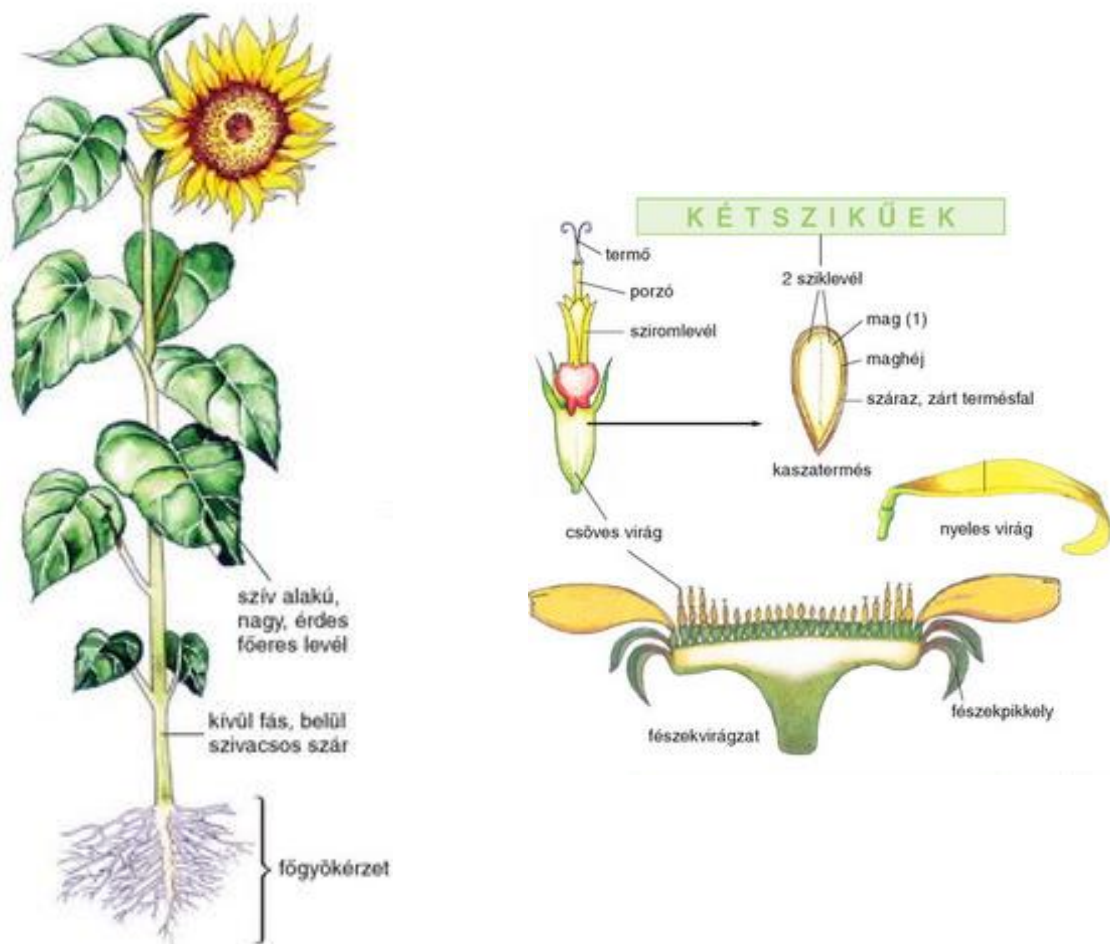
A virágzás több napig tart és a tányér szélétől a közepe felé halad. Naponta 2-3 kör nyílik ki egyszerre. Először a portokok érnek és nyílnak fel. (Benedek 1974; Maróti és Frank 1989). A virágpor a fejletlen bibe csúcsa által elzárt portokcsőben gyűlik össze kiszóródás után. A bibeszál a bibét lassan előre nyomja a portokcsőben, mely az összegyűlt virágportolja maga előtt, végül kiemelkedik a portokcsőből. A bibeszál növekedése a kora délelőtti órákban indul meg és csak a délutáni órákra, vagy másnap reggelre nyúlik meg annyira, hogy a bibe kiemelkedjen a portokcsőből. A fonalas bibeszál végén lévő két receptív lebeny a portokcsőből kiemelkedve és szétnyílván lesz érett a beporzásra (Nyárády 1958; Benedek 1974). A napraforgó

kölcsönös beporzással rovarok útján termékenyül. (http9, Marshall et al. 2023).

Termése kaszattermés, mely a tányéron helyezkedik el, és fajtától függően igen változatos méretű, formájú és színű (http9; http8).

A napraforgó hosszú nappalos, melegkedvelő növény. Csírázáshoz 8°C-os talajhőmérséklet kedvező számára, de rövidebb lehűléseket is jól tolerálja. A hideg tavasz csírázási és kelési problémákat okoz az állományban, valamint kedvez a peronoszpóra fertőzésnek (http6; http7; http9).

A napraforgó nem tűri a monokultúrát, és mivel a legtöbb betegség 6-8 vagy akár még ennél is több évig életképes marad a talajban lévő növénymaradványokon, igényli, hogy minél később kövesse önmagát (Békési 2012).



1. ábra: A napraforgó növény és virágzatának részei
(kép forrása: <http://comeniuskft.hu/taneszkozok/napraforgo.jpg>)

2.2. A napraforgó termesztés története és jelentősége

Az Észak- Amerika nyugati részéről származó növény a 16. században került be és terjedt el Európában. A 17. század közepéig csak a főúri és gazdag polgári családok udvarán, dísnövényként volt megtalálható (Vrânceanu 1977). Magjából étkezési célra való olajat elsőként Erdélyben készítettek a 18. században. A napraforgó táji és művelésmódbeli alakulását a 19. század közepéig a vallás által erősen befolyásolt növénytermesztés határozta meg. Mivel ez eddig használt növényi olajok minőségét felülmúlta a napraforgóból nyert étolaj, magjából az olaj kiperéselése pedig egyszerűbb technikai felszereléssel és könnyebben kinyerhető volt, termesztése a század közepétől lényegesen fellendült Magyarországon (Paládi-Kovács et al. 2001). Jelentőségét az emberi táplálkozáshoz nélkülözhetetlen olajtartalma adja ([http4](#)).

Az 1930-as évekig elágazó, késői és alacsony olajtartalmú napraforgó fajtákat termesztettek (Frank 1989).

A nemesítési munka ekkor kezdődött Magyarországon. Először szelekció útján előállított tájfajtákat (Paládi-Kovács et al. 2001), majd nemesített tájfajtákat termesztettek. A '70-es években nagy olajtartalmú szovjet és magyar fajták kerültek köztermesztésbe, majd egy évtizeddel később a fajtákat hibridek kezdték el felváltani (Frank 1989; Pepó 2007). Hazai termesztésben nagy termőképességű, magas olajtartalmú külföldi hibridek mellé bekerültek az első magyar nemesítésű szegedi és iregszemcsei hibridek is (Frank 1989; Pepó 2005).

Ma a napraforgó az egyik legfontosabb szántóföldi növényünk. Jelentőségét az emberi táplálkozáshoz nélkülözhetetlen olajtartalma adja ([http4](#)). Az olajnövények között világviszonylatban a harmadik helyen áll (Pilorgé 2020). A termesztés 2/3-a Európára összpontosul.

Hazánkban a napraforgót a legfontosabb olajnövényként tartjuk számon (Szabó 2023). Itthoni vetésterülete az 1990-es évek óta szinte duplájára nőtt, az elmúlt tíz évben pedig több, mint 10% növekedést mutat ([http4](#)). A vetésterület növekedése magyarázható a növény sokoldalú felhasználhatóságával, ugyanis a napraforgó nem csak étkezési célú termesztésre biztosít alapanyagot. Olajipari mellékterméke értékes fehérjetakarmány ([http4](#)), de kozmetikai-, ipari-, és közvetett hasznosítással gyógyszeripari felhasználása is ismeretes (Békési 2012.).

A statisztikai jelentésekben nem mindig adják meg külön az étkezési fajták részesedését a vetésterület nagyságából, ezért nincs pontos információnk, de a hazai vetésterület kb 10-15%-án folyik étkezési és hántolási célú termesztés (Pepó 2011).

Az étkezési fajták a napraforgó termékek iránti nagyfokú kereslet miatt biztos piaci háttérrel és kedvező, stabil felvásárlási árakkal rendelkeznek, ezáltal a vetésterülete lassú, de folyamatos növekedést mutat.

2.2.1. Napraforgó fajtahasználat Magyarországon

Az 1930-as évekig a 17. század elején még csak dísznövényként jegyzett napraforgó elágazó, késői és alacsony olajtartalmú fajtáit termesztették (Frank 1989).

A nemesítési munkának köszönhetően először szelekció útján előállított tájfajták (http9), majd nemesített tájfajták kerültek be a termesztésbe.

Az 1970-es években megjelent nagy olajtartalmú szovjet, majd magyar fajták bő egy évtizedig uralták a hazai fajtahasználat repertoárját. (Pepó 2007). Az 1980-as években a fajtákat hibridek kezdték el felváltani (Frank 1989, Pepó 2007).

Magyarországon a nagy termőképességű, magas olajtartalmú külföldi hibridek mellé bekerültek az első magyar nemesítésű szegedi és iregszemcei hibridek is (Frank 1989; Pepó 2005). Napjainkig mégis túlnyomórészt külföldi nemesítésű hibridek termesztése jellemző hazánkban.

2.3. A napraforgó-peronoszpóra

2.3.1. A kórokozó felfedezése és jelentősége

A napraforgót több mint 40 különböző betegség támadja. A gomba kórokozók felelősek a napraforgó betegségeinek legnagyobb hányadáért, melyek közül az egész világon elterjedt, jelentős károkat és akár 100%-os termés kiesést is okozó betegség a napraforgó-peronoszpóra (Paládi-Kovács et al. 2001; Gascuel et al. 2015).

Kórokozója a *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni, az Oocycota törzs *Peronosporaceae* családjába tartozik. Tüneteit először Halsted fedezte fel sédkenderen (*Eupatorium purpureum*). Farlow a kórokozót a *Peronospora halstedii* néven írta le, melyet később módosítottak és átsorolták a *Plasmopara* nemzetségbe (Sackston 1981; Virányi és Spring 2011; Zsiros 2015). Hazánkban 1949-ben jelent meg és első írásos említést Podhradszky János tett róla (Podhradszky 1954).

A *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni biotróf módon parazitáló és táplálkozó szervezet. Célja nem a növény elpusztítása, de jelentős károkat okoz huztóriumaival, mellyel

elszívja a gazdanövénytől a tápanyagot (Virányi 1991; Zsiros 2015). A talajban, továbbá kitartó jellegű oospórák segítségével akár 6-8 évig is életképes marad. Ha a vetőmagtételben található fertőzött kaszat, a kórokozó a vetőmaggal igen nagy távolságra eljuthat.

Peronoszpóra fertőzés esetén csökkent termésmennyiségre, erős fertőzéskor akár teljes állománypusztulásra is számíthatunk (Sackston 1981).

Veszélyessége leginkább nagyfokú genetikai változékonyságában rejlik. A kezdetben patológiailag egységesnek hitt kórokozóról az 1970-es évek bizonyosodott be a hibás feltételezés mikor a 100-as és 300-as patotípusról beszámoltak. Az elkövetkezendő években újabb és újabb patotípusok megjelenését írták le (Virányi 1991; Gulya et al. 1996; Gulya 2007; Rudolf et al. 2011; Bán et al. 2014a; Bán et al. 2014b). Világszerte 44 különböző *Plasmopara halstedii* patotípust azonosítottak (Sedlářová et al. 2016).

2.3.2. A napraforgó peronoszpóra patotípusok meghatározása

A *Plasmopara halstedii* patotípusok meghatározása és megbetegítő képességüknek összehasonlítása sürgetővé vált az egyre intenzívebbé váló napraforgó hibrid nemesítés és a köztermesztésbe vont fajták vetésterületének gyors ütemű növekedése miatt (Zsiros 2015). A virulencia nemzetközi összehasonlíthatóságára egységes vizsgálati módszertan kidolgozására Sackston és munkatársai (1990), valamint Gulya és munkatársai (1991b) tettek javaslatot.

A mai napig nemzetközi szinten használatos differenciáló teszt kidolgozását Tourvieille De Labrouche és munkatársai (2000), napraforgó-nemesítő intézetek és növénypatológusok nemzetközi összefogásának köszönhetjük.

A teszt kilenc beltenyésztett vonalból áll, melyek sorrendje a teszt értékelésekor kötött és úgynevezett tripleteket alkotnak. Értékeléskor a fogékonyság alapján ezek a tripletek kapnak egy értékszámot, mely számokat egymás mögé írva kapjuk meg a vizsgált *Plasmopara* izolátum patotípus kódszámát (Tourvieille De Labrouche et al. 2000; Zsiros 2015).

2.3.3. A napraforgó-peronoszpóra gazdanövényköre és ökológiai igényei

Bár a *Plasmopara halstedii* főként a napraforgót fertőzi, megbetegedéseket írtak le csicsóka (*Helianthus tuberosus*), szerbtövis (*Xanthium strumarium*), parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia*), rézgyom (*Iva xanthiifolia*) és selyemmályva (*Abutilon theophrasti*) állományokban is (Frank és Szendrő 2011; Virányi és Spring 2011; Zsiros 2015).

A napraforgó-peronoszpóra csapadékigénye a legmagasabb a napraforgót támadó betegségek közül. A kórokozó fertőzéséhez a megfelelő csapadékkal és páratartalommal párosult hűvösebb (14-19 °C) tavasz kedvez (Horváth 1995, [http10](#)). A csírázás és fiatalkori fejlődéskor a kórokozónak cseppfolyós vízre van szüksége (Békési 2012), a sporulációhoz pedig elengedhetetlen a magas páratartalom.

2.3.4. A napraforgó-peronoszpóra tünetei

A fertőzés kialakulásának szempontjából elsődleges (primer) és másodlagos (szekunder) fertőzési formákat különböztetünk meg. Az áttelelt kórokozó talajból és kaszatóból induló fertőzését értjük primer fertőzés alatt (Bán 2006). Ez a csírákorban megjelenő fertőzés a növény törpülésével, ízközők rövidülésével, sűrű levélállással jár. A levél erek mentén klorózis alakul ki, a kórokozó sporangiumtartói és sporangiumai alkotta fehér színű bevonatot láthatunk a levelek fonáki és egyre gyakrabban a színi részén is (2.ábra). A beteg növényen fölfelé álló, torz, fejletlen kaszatókkal teli apró tányér képződik, vagy a tányér képződés elmarad ([http11](#)). Erős fertőzés esetén a növény pár lomblevelés állapotban elszárad, elpusztul (Zsiros 2015).

A betegség másodlagos tüneteit a sporangiumok indítják el. Következménye a leveleken levélerek által határolt kisméretű, világoszöld, olajfolthoz hasonlító, a termést nem befolyásoló klorotikus foltok megjelenése a levél fonáki részén fehér bevonatot eredményezve. Ezekből a foltokból kiindulva a kórokozó szisztemizálódhat a növényben és bejuthat a képződő magokba is (Spring 2009; Zsiros 2015; [http11](#)).

A másodlagos tünet szisztemizálódása a fertőzött növényi rész légzőnyílásain át képződött, sporangiumtartókról lefűződő ivartalan szaporítóképletek légmozgással, más növényekre, növényi részekre jutásával történhet (Bán et al. 2017)

A kórokozó a talajba visszakerült növényi maradványokban oospórákkal, a kaszatók belsejében, micéliumos alakban telelve marad fenn (Zsiros 2015).



2. ábra: A napraforgó peronoszpóra primer fertőzési tünetei (balról jobbra: sporangium bevonat csíranövényen, sűrű levélállású, törpült növény, sporangium bevonat a levél fonáki részén) (saját fotó, 2022.)

2.3.5. Napraforgó-peronoszpóra elleni védekezés

A napraforgó-peronoszpóra elleni védekezés első és legfontosabb eleme a megelőzés (http2). A fertőzött növényi maradványok leszántásával, csíramentes talajállapot fenntartásával a vetésváltás 5–6 éves periódusának megtartásával, a gazdanövények (napraforgó árvakelések, gyomnövények) időben való megsemmisítésével (http10), az optimális vetésidő alkalmazásával, a megfelelő minőségben elvégzett fungicid csávázással (Pecrix et al. 2018), a tünetek megjelenésekor kontakt és szisztémikus hatóanyagú készítmények kombinációjának (http11), valamint rezisztens fajták termesztésének (http15) együttes alkalmazásával lehet csak sikeres.

A kórokozóval szembeni védekezés során elengedhetetlen az integrált szemlélet, azonban hiába áll rendelkezésünkre csávázószer, ha annak hatóanyagára az újabb *Plasmopara halstedii* rasszok ellenállóságot mutatnak. Ezért a leghatékonyabb megoldásnak a fertőzést előidéző patotípusok elleni rezisztencianemesítés tekinthető. A nemesítő cégek ezen oknál fogva fektetnek kiemelt hangsúlyt a napraforgó-peronoszpóra rasszok elleni rezisztencia kialakítására és a peronoszpóra-rezisztens fajták előállítására (http11), melyhez nélkülözhetetlen a kórokozó folyamatos monitorozása és jellemzése.

A napraforgó-peronoszpórával szemben az ellenállóságot az ún. *Pl* gének biztosítják a

hibridekben (Bán et al. 2016). A betegségrezisztencia nemesítésben a diagnosztikai DNS-markerek felbecsülhetetlen értékű erőforrást jelentenek a rezisztencia gének beépítésében, piramidálásában és a beépítés sikerességét igazoló vizsgálatok elvégzésében.

Az 1990-es évek végén a *Plasmopara halstedii* populációban kialakult mefenoxam rezisztencia a vetőmag előállítókat az USDA által kibocsátott *Pl* géneket (*Pl6*, *Pl7*, *Pl8*) tartalmazó vonalak felhasználásával a „minden ismert fajjal” szemben ellenálló hibridek előállítására sarkallta (Virányi et al. 2015).

A HA-335-ben és HA-336-ban található a *Pl6* gén (Virányi et al. 2015), mely a 2010-es évek elején a legjelentősebb *Pl* gén volt a kórokozóval szembeni ellenállóság biztosításában (Gulya et al. 2011; Liu et al. 2012). Magyarországon az állami elismerési eljárásban az adott fajtajelöltnek ellenállónak kell lennie a 330-as, 700-as, 710-es és 730-as *Plasmopara* patotípussal szemben. Ezen patotípusokkal szemben az ellenállóságot a *Pl6* gén biztosítja (Gilley et al. 2020). A fajtajelölt akkor tekinthető ellenállónak, ha a NÉBIH provokációs fertőzési tesztjén egyik patotípussal sem fertőződik meg 10%-nál erősebben. (http15).

Az RHA 340-es USDA vonal peronoszpóra elleni rezisztenciáját pedig egyetlen domináns gén, a *Pl8* szabályozza (http3), mely a 314-es, 704-es, 714-es, 734-es és 774-es patotípusokkal szemben is ellenállóságot mutat (Gulya et al. 2011), így védelmet biztosít az utóbbi években Magyarországon megjelent új rasszokkal (704, 714) szemben (Rudolf et al. 2011; Bán et al. 2017; Virányi et al. 2015).

Továbbá a napraforgó hozamának és jövedelmezőségének fenntartása a genetikai rezisztencián túl további, új védekezési lehetőségek kutatásától is függ, amelyek beépíthetők a napraforgóbetegségek elleni sikeres nemesítési stratégiákba.

2.4. Növénynemesítés

2.4.1. Napraforgó nemesítés

A napraforgó a hibridnemesítés szempontjából a kukorica után a második legjelentősebb kultúrnövény (Seiler et al. 2017).

A sokszínű gyomirtási technológia és az olajnövény sokrétű felhasználhatósága miatt a napraforgópiac különösen fragmentálódott, így a napraforgó nemesítési szempontból igazi kihívást jelent (Bíró 2018). Míg az 1990-es években a napraforgó termesztés csak 12 szegmense létezett a világon, tehát a nemesítőnek/nemesítőháznak összesen 12 különböző célra (pl. eltérő

érésidők, eltérő olajtartalom, eltérő éghajlati zónák, stb.) kellett hibrideket nemesítenie a globális piacra kerüléshez, addig 2020-as évek végére a piaci szegmensek háromszorosára nőttek a herbicidtolerancia elterjedésének és uralkodóvá válásának köszönhetően (Bíró 2018).

A modern napraforgó nemesítés célkitűzései közé tartozik a génállomány bővítésével új nemesítési módszerek és technikák, valamint molekuláris markerekre alapozott szelekciós eljárások alkalmazása, hatékony és széles körű tesztelés, fajtakísérletezés úgy, hogy szem előtt tartjuk a még kedvezőbb agronómiai tulajdonságokra (szár, gyökér, tányér), betegségekre (ezen belül elsősorban peronoszpóra, szklerotínia és szádor), valamint a herbicid rezisztenciára való nemesítést, mellyel túlszárnyalhatjuk az eddigi köztermesztési eredményeket (Bíró 2018).

A napraforgó olyan növény, amelynél a genetikai rezisztencia nagy szerepet játszik a betegségek és a parazita gyomok elleni védekezésben, a tartós termésnövekedés pedig nagymértékben függ a minőségi tulajdonságokon alapuló nemesítéstől (Pilorgé 2020).

2.4.2. Az étkezési napraforgó nemesítés kihívásai

A *Helianthus* nemzetség sok fajból áll. A termesztett napraforgón, a *Helianthus annuus* L. olajtartalma szerint olajipari és étkezési típusra bontható. Az étkezési fajták olajtartalma maximum 35%, fehérjetartalma pedig 25–30% (Škorić et al. 2012).

Az étkezési napraforgó termesztés jelentősége a növény előnyös táplálkozás-élettani tulajdonságai következtében folyamatosan nő (Szabó et al. 2009), nemesítése pedig külön trendet képvisel a napraforgó piacon. A különböző piacok igényei eltérőek, az igények kielégítéséhez pedig specifikus erőfeszítések szükségesek a nemesítés terén (Pilorgé 2020).

Olajipari fajtákkal ellentétben az étkezési fajtáknál nem az olajsav tartalom, és a minél nagyobb termésátlag, hanem a minőségi alapanyag, az íz, a kaszat külleme (színe, formája, alakja, hossza), a héj-bél aránya a fontos, beltartalmi értékek közül pedig a fehérje tartalom és aminosavak aránya.

Így a piac elvárásai szerint, a növény sokoldalúságát kihasználva az étkezési napraforgó nemesítésben magas minőségre és több betegséggel szembeni rezisztenciára kell helyezni a hangsúlyt (Feng et al. 2022).

2.5. Az étkezési napraforgó nemesítésének története és jelenlegi helyzete munkahelyemen

Cégünk egyik alapítójának és tulajdonosának köszönhetően közel 20 éve jött létre nemesítési csoportunk azzal a célzattal, hogy a kereskedelmi tevékenységünkhöz szükséges áruanyagot hosszútávon saját étkezési napraforgó hibridekkel biztosítsuk.

Nemesítési projektjeink célja, hogy a zárt rendszerben termeltetett korábbi hibrideknél magasabb termőképességű, eddig nem létezett vetőmagok jöjjenek létre, és a részben vásárolt vetőmag helyett az általunk kinemesített és előállított vetőmaggal fedjük le napraforgó termeltetési területünk 100%-át. Ezért munkánkat a menedzsment által meghatározott nemesítési szegmensekre és elvárásokra fókuszáljuk.

A kezdeti nemesítési munka külsős partnerekkel szoros együttműködésben indult. Miután cégünk nemesítési csoportja önállóvá vált, az addig részünkre fejlesztett vonalak mellett néhány további vonalat is megvásároltunk. Ezen vonalak fajtafenntartó és fajtajavító nemesítésére mai napig kiemelt figyelmet fordítunk, hiszen ezek alkotják nemesítési alapanyagaink vázát. Hazai tájfajták feltételezhető leszármazottaival, külföldről vásárolt vonalakkal, vadfajokkal és különböző rezisztenciagén forrásokkal kiegészítve használjuk fel őket új vonalak előállítására.

Új vonal- és fajtaelőállítás mellett fajtafenntartással, fajtajavítással, Rf-teszt és teszthibrid keresztezésekkel, ezek kitermesztésével és megfigyelésével foglalkozunk nemesítői munkánk során.

Vonalainkon a nemesítés célirányának megfelelően single cross, back-cross és top-cross keresztezéseket továbbá pedigre módszeren alapuló egyedszelekciót és tömegszelekciót is végzünk. Saját anyagainkat többféle kísérletnek és vizsgálatnak vetjük alá, mielőtt teszthibrid keresztezésbe vonnánk őket, melyek közül az egyik a napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztencia vizsgálat.

Nemesítési portfóliónkban a kezdetek óta kiemelt fontosságú a megtermelhetőség és feldolgozhatóság szempontjából kedvező tulajdonságokkal rendelkező fekete, étkezési napraforgómag kinemesítése. Az általunk végzett nemesítési munka jelentőségének és fontosságának szerepe napjainkra, az étkezési napraforgó hibrid vetőmag beszerzésének korlátozottsága miatt nyert bizonyosságot; ugyanis fekete alapszínű, étkezési napraforgó hibrid vetőmagot az utóbbi években külföldről beszerezni nem lehet. Bár igény az van rá, jelenleg nincs ilyen a piacon.

A fekete vetőmag mellett jelenleg párhuzamosan fehér és csíkos alapszínű, jobb betegség ellenállóképességgel, herbicidrezisztenciával rendelkező étkezési hibridek kinemesítésén dolgozunk.

2.5.1. Étkezési napraforgó nemesítésben elért friss eredményeink

2021-ben állami elismerésben részesült fekete alapszínű napraforgó hibridünk, melynek kaszattermése, olajtermése és fehérjetartalma magasan felülmúlta az étkezési fajták csoport átlagát. A hatósághoz 2019-ben jelentettük be fajtaminősítésre ezt a 180cm magas, jó szárszilárdságú, szárdőlésre és szártörésre még a tenyészidő végén sem hajlamos, fekete alapszínű, konvencionális hibridünket. A hibrid jó vízleadóképességének köszönhetően a betakarításához nincs feltétlenül szükség állományszárításra. Egységes színnel, magas termés potenciállal és kiváló héj-bél aránnyal jellemezhető, fix piaccal rendelkező magyar termék. Jó ízű napraforgó mag, melynek snack frakciója 80% feletti.

2022-ben jelentettük be fajtaminősítésre szürke-csíkos, konvencionális hibridünket. Szülővonalai már 2021-ben DUS vizsgálaton vettek részt, melyen jól szerepeltek. A 2022-es évi vizsgálaton mind a szülővonalak, mind a hibrid megfelelt. Jelenleg a 2023-as évi vizsgálati eredményeket várjuk és bízunk a hatóság pozitív előterjesztésében.

2.6. Hímsteril napraforgó nemesítési felhasználása

Új vonal indítás és génbeépítés során a pollent adó növény (B vonal/ restorer vonal), melyet recipiens partnerként használunk a donor pollenjének befogadására, sterilé tehető gibberellinsavas hormonkezeléssel (GA₃) vagy kasztrálással, így várhatóan a következő generáció összes növénye F1 lesz.

2.6.1. Gibberellinsav

A gibberellinsav (Gibberellic Acid/ GA) egy erős aktivitású, természetes eredetű, a növény növekedését és fejlődését elősegítő; a csírázásra, az ivarexpresszióra, a termés fejlődésre hatással levő, a környezeti tényezők kölcsönhatását serkentő növény-növekedés-szabályozó. A bioaktív GA főleg a növények pollen produktivására és a kocsány növekedésére gyakorol hatást (Gupta and Chakrabarty 2013).

Egy patogén gomba, a *Gibberella fujikuroi* laboratóriumi elemzésekor azonosított

vegyületek egyikét gibberellin A-nak nevezték el. A GA₃ az ebből azonosított gibberellinek egyike, mely agronómiai, kertészeti és egyéb tudományos célokra a leggyakrabban előállított gibberellin (Gupta and Chakrabarty 2013).

3. Vizsgálatok módszerei

3.1. Steril növény létrehozása új vonal indításhoz, génbeépítéshez

3.1.1. Napraforgó gibberellines (GA3) kezelése

3.1.1.1. GA3 oldat elkészítésének menete:

A hormon 70%-os alkoholban oldódik, ezért első lépésként elkészítünk egy 70%-os alkohol oldatot. Ehhez 100g oldat esetén 72,9g 96%-os alkoholra és 27,1g desztillált vízre van szükségünk. Következő lépésként egy letárazott mérőedénybe 1-2ml 70%-os alkohollal az alufólia felületéről a mérőedénybe mossuk a kimért hormont figyelve arra, hogy az teljesen feloldódjon. A GA₃ oldatot desztillált vízzel, g-ban mérve a kívánt oldat mennyiség eléréséig hígítjuk.

3.1.1.2. A napraforgó csillagbimbó kezelése GA3 oldattal:

A GA₃ oldatot elkészítését követően összekészítjük a kezeléshez szükséges eszközöket, melyek a következők: gumikesztyű, fecskendő, vastag injekciós tű, vatta, folpack, olló, növény jelölő címke, lakkfilc.

Az oldat bomlékonyságát szem előtt tartva a kezelésre a hajnali vagy a kora esti órákban kerítünk sort. Kiválasztjuk a megfelelő fejlettségű, kb 1,5cm-es csillagbimbóval rendelkező növényeket melyeket kezelni szeretnénk, majd ezeket a növény jelölésére szolgáló címkével látjuk el, azon a kezelést (G, mint giberrelinnel kezelt) és egyéb, a növény beazonosítását segítő adatokat (pl. növény tenyészkerti elhelyezkedése) feltüntetve.

Az injekciós tűt a bimbó közepébe 1-2mm mélyen beszúrjuk és oldatot fecskendezünk bele úgy, hogy az oldatból egy csepp megjelenjen a bimbó felületén is. Ezután az oldattal átítatott vattapamaccsal lefedjük a bimbót (3.ábra).

A biztos siker érdekében a kezelést többször megismételjük (Marshall et al. 2023). Az utolsó kezelést követő napon a folpackot és a vattát óvatosan eltávolítjuk a bimbóról.

A GA₃ elősegíti a fejlődést, ezért a kezelés hatásaként elsőként a növény gyors megnyúlásával találkozunk. A nyúlásnak indult növényt az esetleges sérülések elkerülése érdekében kikarózzuk. Karózáskor a növény szárát 2-3 ponton anyagdarabbal rögzítjük a

növény mellé leütött fakaróhoz úgy, hogy azzal lehetőleg ne okozzunk felesleges deformitást a növekedési szakaszban. A kezelt növényeknél korai virágzást és pollenhiányt várunk. A kezelés sikerességében 100%-ig akkor lehetünk biztosak, ha elkezdődött a virágzás.



3. ábra: Napraforgó csillagbimbó gibberellines kezelése (saját fotó, 2022)

3.1.2. A napraforgó kasztrálása

Kasztrálás során a recipiens növény porzóit a pollen kiszóródása előtt, az önmegporzás megakadályozása végett eltávolítjuk. Kasztrálást követően életképes pollent gyűjtünk a donor növényről, melyet a kasztrált növény bibéjére juttatva végezhetjük el a megtermékenyítést. A kasztrálási technikát a növény virágzata és a virágzás módja befolyásolja (Pepó 2010).

A növény sterillé tételekor a kasztrálást akár tekinthetjük a GA₃ kezelés „B” opciójának is, hiszen abban az esetben, ha a giberellinnel kezelt növényen a virágzás elején vesszük észre, hogy az eljárás nem sikerült és poros maradt a növény, a kasztrálásával a steril növény létrehozása még lehetséges.

A kasztráláshoz szükségünk van izoláló hálóra, mellyel a kasztrált növény tányérját elszeparálhatjuk az idegen pollentől. Továbbá késre, csipeszre, spricflaskára, vízre, növényjelölő címkére és lakkfilcre. A kasztrálásra az éppen virágzás elején lévő növény megfelelő, melynek még csak az első 2-3 köre nyílik.

A kasztrálást a bibeszál növekedésének kezdete előtt a reggeli órában végezzük. A kasztrálni kívánt növényeket elsőként címkével látjuk el, melyen a kezelésre (K, mint kasztrált) és a növény beazonosítására szolgáló adatokat (pl. növény tenyészkerti elhelyezkedése) felrögzítettük. Ezt követően a pikkelylevelek és a nyelves virágok eltávolítását végezzük el a tányér szélének késsel történő körbevágásával. A kiválasztott növény tányérjában kinyílt körökben található összes portokot egyesével távolítjuk el csipesszel. A tányért a kasztrálás

után izoláló hálóval kötjük le, hogy az idegenbeporzást elkerüljük.

Kb 30 db megtermékenyült kaszat a minimum szükségletünk ahhoz, hogy az új anyaggal a következő szezonban el tudjuk kezdeni a munkát. A biztonság kedvéért egy apavonal esetében ehhez a tányér felén végezzük el a kasztrálást. Mivel naponta egyidejűleg 3-5 virágkörben nyílnak a virágok (Benedek 1974; Benedek 1983), ezt a folyamatot a tányér nagyságától függően két-három egymást követő napon megismételjük (Marshall et al. 2023). Egy tányér több száz virágot tartalmaz, ezért az utolsóként elvégzett kasztrálást követően a tányér közepét késsel vagy szikével kivágva távolítjuk el a felesleges virágokat (4. ábra).



4. ábra: napraforgó apavonal kasztrálásának bemutatása képekben (bal fent: kasztrálásra érett növény, jobb fent napraforgó tányér kasztrálása csipesszel, bal lent: napraforgó tányér az első kasztrálás után, jobb lent: kivágott közepű, beporzásra előkészített kasztrált napraforgófej. (saját fotó, 2023)

A donor növényről gyűjtött virágport a receptív lebenyek szétválását követően mókusször ecset segítségével a bibére juttatva elvégezzük a beporzást. A bibe a szabályos beporzás és megtermékenyülés után másnapra visszahúzódik. (Vrânceanu 1977).

3.2. A rezisztenciagén beépítés sikerességét ellenőrző vizsgálati módszerek

3.2.1. *Pl* gén jelenétének kimutatása PCR vizsgálattal

3.2.1.1. Levélmintagyűjtés PCR vizsgálathoz

A rezisztenciagén PCR módszerrel történő kimutatásához levélmintára van szükségünk. A vizsgálat elvégzéséhez fiatal növényi szövetre van szükségünk, így a levélminta gyűjtését a napraforgó fiatal, lehetőleg 6-10 leveles állapotában igyekszünk elvégezni. Ha valami okból kifolyólag szükségessé válik a levélminta későbbi begyűjtése, azt addig tehetjük meg, amíg a napraforgó újabb és újabb leveleket hoz, azaz a virágzást megelőző napokig.

A levélmintagyűjtés előkészítését egy lista összeállításával kezdjük a vizsgálandó napraforgó vonaláról, melyet az előző évi vizsgálati eredmények és a szántóföldön végzett növénymegfigyelések függvényében állítunk össze. A mintagyűjtéshez szükséges eszközök: az összeállított lista, gumikesztyű, olló, alkohol, alufólia, visszazárható tasak, hűtőtáska, jégakku, növényjelölő címke, lakkfilc.

A mintázandó növényeket a növény jelölésére szolgáló címkével látjuk el, azon a mintagyűjtést és egyéb, a növény beazonosítását segítő adatokat feltüntetve.

A mintagyűjtést gumikesztyűben végezzük. Alkoholal fertőtlenített olló (5. ábra) segítségével levágunk egy vagy két kisebb, fiatal levelet az adott növény felső levélemeletéről (6. ábra). A levélmintát alufóliába csomagoljuk és ráírjuk a növény azonosítóját. Ezután az alufóliába csomagolt leveleket egy olyan visszazárható tasakba helyezük, melyen feltüntettük a mintagyűjtés dátumát, és azt, hogy mely rezisztenciagén detektálására gyűjtöttük a mintát. A mintákat a szántóföldön minden esetben jégakkival ellátott hűtőtáskába gyűjtjük és minél hamarabb beszállítjuk a laboratóriumunkba, ahol -20 °C-on tartjuk a vizsgálatok elvégzéséig.



5. ábra: Alkoholos eszköz fertőtlenítés két egymást követő levélminta begyűjtése között (saját fotó, 2023)



6. ábra: Levélminták begyűjtése a felcímkézett növényekről (saját fotó, 2023)

3.2.1.2. DNS kivonása növényből módosított CTAB módszerrel

Növényenként 1 gramm mintára van szükségünk, melyet analitikai mérlegre helyezett alufóliára mérünk ki steril szikepenge segítségével. Az alufóliát és a pengét növényenként cseréljük a kontamináció elkerülésére. A kimért mintát izoláló zacskóba helyezzük.

2%-os CTAB (http13) (8 pH) pufferből vizsgálandó mintaként 7 ml-t laborüvegbe mérünk, melyhez 0,2%-os töménységben merkaptotetanolt adunk és jól elkeverjük. Az elegyből minden mintához 7ml-t adva a pufferben elhomogenizáljuk a növényi mintát műanyag kalapács és kézi homogenizáló segítségével, majd a növényből 700 µl növényi nedvet eppendorf csőbe helyezünk és száraz blokktermosztátban 60°C-on inkubáljuk 20 percig.

Inkubálást követően a növényi nedvhez 700 µl kloroformot adva 1 percig rázogatójuk, majd 10 percig 10000 rpm-en centrifugáljuk. 1,5 ml-es steril eppendorf csőbe a felúszóból 500 µl leszívunk, melyet 500 µl izopropanollal 1 percig rázogatóunk. A csöveket ismét 10 percig 10000 rpm-en centrifugáljuk. A csövekben csak a növényi DNS-t tartalmazó pellet marad a folyadék leöntése után.

A csöveket fejjel lefelé fordítva jó nedvszívó képességű papíron 1 percig szárítjuk, majd 1ml 70%-os etanollal 5percig 10000 rpm-en centrifugáljuk. Az előző folyamatot megismételve a folyadékot ismét leöntjük és a csöveket fejjel lefelé 1 percig szárítjuk. A maradék etanol a csövek centrifugálása után pipettával szívjuk le.

A csöveket nyitott állapotban, szobahőmérsékleten 1-1,5 óráig szárítjuk. Ha a pelletek kiszáradtak, a csövekbe 100 µl TE puffert (1.1. melléklet) teszünk és vortex-el felkeverjük,

majd 60°C-on 5-10 percre termosztátban inkubáljuk. A pelletek feloldódása után vortex-el elkeverjük a pufferben és -20 °C-on tároljuk.

3.2.1.3. *Pl6* gén kimutatása növényi DNS-ből

A *Pl6* rezisztenciagén ellenőrzésére alkalmazott detektálási módszertant a Genlogs Biodiagnosztikai Kft. dolgozta ki cégünk részére. A felek kölcsönösen aláírt üzleti titoktartási nyilatkozata miatt a módszertan alább csak az üzleti titoktartás megszegése nélkül közölt.

A -20 °C-on tárolt TE-ben feloldott DNS-t kioldasztjuk. A vizsgálandó minták mellett a PCR vizsgálathoz szükségünk lesz egy negatív és pozitív kontroll, valamint egy DNS-t nem tartalmazó minta (master mix) használatára is.

A PCR-hez Master mix-et készítünk egy 1,5 vagy 2 ml-es eppendorf csőbe. 1 mintához 15,3 µl H₂O, 5 µl green buffer, 2 µl MgCl₂(25 mM), 0,5 µl dNTP mix (100 mM), 0,5-0,5 µl a forward és reverse primerből (10µM), végül 0,2 µl Taq polimeráz 5 U/µl enzim szükséges.

A master mixet összerázzuk és 0,2ml-es PCR csövekbe mérünk ki belőle pipettával mintánként 24 µl-t. A DNS-t nem tartalmazó kontroll minta kivételével minden csőbe 1 µl TE-ben oldott DNS-t (20 ng/ µl) adunk és a csöveket lezárjuk. A PCR-csövek bekerülnek a PCR-készülékbe az alábbi, primernek megfelelő programra (2.1.melléklet): 90°C 3perc, majd 33 ciklusban ismételve 94°C 10 mp, 60°C 30 mp, 72°C 90 mp, végül 72°C 5perc.

A keletkezett PCR termékekből 10 µl-t futtatunk meg mintánként 1,5%-os agaróz gélben 1x TAE futtató pufferben (1.2. melléklet), vízszintes gélfuttatóban 80V-on, 70 percig. A futtatásnál 1 KB DNS markert (Bench Top, product Nr.: D0428, 1kb DNA ladder) kell alkalmazni. Végül géldokumentációs rendszerben (AlphaImager Mini from ProteinSimple) megnézzük és lefotózzuk a gélt.

3.2.1.4. *Pl8*gén gén kimutatása növényi DNS-ből

A lefagyasztott mintákat jégbe hűtve szállítjuk a MATE Budai Campusára, ahol a Genetika és Növénynemesítés Tanszék laboratóriumában végzik el a *Pl8* rezisztencia gén kimutatására irányuló PCR vizsgálatot (PCR vizsgálat leírása) és a PCR sikerességének ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történik.

A *Pl6* gén detektálási módszeréhez hasonlóan csak a primerek (2.2. melléklet) és a program tér el ebben az esetben.

PCR-mix összetétele: 2 µl Templát DNS, 15,2 µl Steril víz (MQ), 2,5 µl 10 X PCR-

puffer, 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl Reverse primer (10µM), 1 µl Forward primer (10µM), 0,5 µl dNTP mix (100 mM), 0,3 µl Taq-polimeráz (5 U/µl).

PCR program: 95°C 3perc, 35 ciklusban ismételve: 94°C 1perc, 50°C 1perc, 72°C 1perc, végül 72°C 5perc.

A rezisztenciával és fogékonysággal kapcsolat allélok közti különbség agaróz gélelektroforézissel nem kimutatható, ezért a nagyobb felbontást biztosító fragmentumhossz-analízis használata is indokolt.

A vizsgálti eredmények a céggel megállapodott időtartamon belül elektronikusan érkeznek meg, melyeket a Peak Scanner Software v1.0 segítségével értékelnek ki.

3.2.2. Napraforgó-peronoszpóra ellenállóság felmérésre irányuló provokációs kísérlet

Provokációs kísérletet végzünk a *Pl6* rezisztencia gén PCR vizsgálata során nem egyértelműen pozitív eredményt mutató apa növényeken, mely segít eldönteni, hogy az adott apajelölt egyéb tulajdonságait figyelembe véve, hogyan folytassuk vele a jövőbeli munkát, továbbá segít meghatározni a következő évi génbeépítések során alkalmazandó *Pl6* donorok körét.

A provokációs kísérletben a vizsgált vonalak eredményeit majd egy fogékony (iregi szürke csíkos vagy HA- 89) és egy rezisztens (HA-335) kontroll minta eredményeihez viszonyítva értékeljük. Egy mintát egyidejűleg két ismétlésben vizsgálunk.

3.2.2.1. Napraforgó peronoszpórával fertőzött növény részek gyűjtése és tárolása

A provokációs peronoszpóra teszthez szükséges fertőzött növényi minták gyűjtését termeltetési kollégáink és termelőink segítségével végezzük.

A fertőzött növényi részek begyűjtésénél feljegyezzük a gyűjtő nevét, a gyűjtés helyét, dátumát és amennyiben ismert a fajtát is, melyről a mintát szedtük. Ezeknek az információknak a későbbi beazonosítás, esetleges rassz meghatározásra irányuló vizsgálatok esetén van kiemelkedő jelentősége. A provokációs vizsgálatok elvégzéséhez szennyeződésmentes fertőzött növényi részekre van szükség, ezért csak olyan levél gyűjthető be, mely nem földes. Több növény egyidejű begyűjtése esetén minden növényt külön mintaként kezelünk, így begyűjtése is külön történik. A begyűjtött mintát papírba csomagolva és a begyűjtésre

vonatkozó adatokkal felcímkézve helyezük hűtőtáskába és a lehető legrövideb időn belül beszállítjuk a laborba.

3.2.2.2. Laboratóriumi teendők a fertőzött növényi részekkel

A laborba érkezett mintákat a gyűjtési adatok és a minta szennyeződésmertességének leellenőrzésével kezdjük, majd az adatokat direkt erre a célra fenntartott jegyzetbe rögzítjük.

A minták számának megfelelő mennyiségű Petri csészét készítünk elő, melyekre a minta egyedi sorszámát és a gyűjtés dátumát fogjuk felírni.

Az egyes levelekről lefertőtlenített ollóval eltávolítjuk a nem fertőzött részeket (levélér, levélnyél, levélszél), és a fertőzött levelet kisebb darabokra vágva Petri-csészébe helyezük (7.ábra), befőttes gumival átkötjük és ultra mélyhűtőbe helyezük, ahol a minták -70°C -on évekig eltárolhatóak.



7. ábra: Ultrafagyasztóban való tárolásra előkészített peronoszpóras levélminták (saját fotó, 2020.)

3.2.2.3. Provokációs kísérlet beállítása

A vizsgálandó vonalokból ismétlésenként 5-10 db kaszatot tesztelünk (a felhasznált kaszatomennyiség a rendelkezésre álló összes kaszatomennyiségétől függ).

A kaszatokon néhány percig 15%-os hipóoldatban áztatással, majd a hipószag eltűnéséig folyó csapvíz alatt történő atmosférai fertőtlenítést végzünk. Ezt követően a kaszatokat nedves szűrőpapírba csavarva 12 órás megvilágítás mellett 24°C -on 2-3 napig csíráztatjuk. A csíranövényeket vonalanként felcímkézett Petri csészébe helyezük a fertőző oldat elkészítéséig.

A fertőző oldat elkészítéséhez a korábban gyűjtött, -70°C -on tárolt fertőzött levelekből néhányat főzőpohárba helyezünk és desztillált vízben egy ecset segítségével lemossuk felületükről a sporangiumokat. Bürker kamra segítségével a sporangium szuszpenziót $48\,000$ db sporangium/ml sűrűségűre beállítva végezzük el a fertőzést a WSI- módszert (Virányi 1977) alkalmazva. A Petri csészébe helyezett kaszatokat felöntjük a szuszpenzióval úgy, hogy a kaszatok ússzanak a csészében és 16°C -ra, sötétbe, néhány órára termosztátba helyezzük.

A csíranövényeket másnap tiszta, virágfölddel töltött cserepekbe ültetjük és véletlenszerű elrendezésben a növénynevelő polcra helyezzük, ahol 12-14 órás megvilágítás mellett $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$ -on neveljük őket hét napig (8. ábra).

A hetedik napon a világítást lekapcsoljuk, a hőmérsékletet $16\text{-}17^{\circ}\text{C}$ -ra mérsékeljük, és a cserepeket zsákba húzzuk, melyekbe előzetesen desztillált vizet spriccelve megteremtjük a



8. ábra: növénycserepek véletlenszerű elrendezésben a növénynevelő polcon (saját fotó, 2022)

fertőzéséhez szükséges mikroklímát (9. ábra). A nyolcadik napon értékeljük a szikleveleken megjelenő sporulációt a negatív és pozitív kontroll mintához viszonyítva.

Az értékelést követően a növényeket 12-14 órás megvilágítás mellett, $20\text{-}22^{\circ}\text{C}$ -on tartva tovább neveljük az első lomblevelek megjelenéséig, hogy a kialakuló másodlagos fertőzési tüneteket is értékelhessük.



9. ábra: sporuláltatás céljából zsákba húzott növények (saiát fotó. 2022)

A provokációs kísérletben alkalmazott töménységi, hőmérsékleti és megvilágítási adatokat az adott laborkörülményekhez szakirodalmi forrásokra alapozva és korábbi napraforgó-peronoszpórával kapcsolatos tanulmányaimra, kísérleteimre támaszkodva adoptáltam.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Új vonal indítások és génbeépítések sikerességének értékelése gibberellin és kasztrálás alkalmazásának tükrében

A napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztencia nemesítésre a 2020-as évtől kiemelt hangsúlyt fektetünk, ezért ahogy a későbbiekben a rezisztenciagén vizsgálatoknál, úgy az új vonal indítások és génbeépítések sikerességének értékeléséhez is az elmúlt 4 év adatait vettem alapul. (1. táblázat).

1. táblázat: GA₃ oldattal és kasztrálással kezelt növényekből történő újvonal indítások és génbeépítések eredményessége 2020-2023 között

Kezelés éve	Kezelés típusa	Kezelt növények száma (db)	Megporzott növények száma (db)	Termékenyült növények száma (db)		Nem termékenyült növények száma (db)
				növényszám, ahol a kaszatok száma nem éri el a kívánt minimum mennyiséget	növényszám, ahol a kaszatok száma eléri a kívánt minimum mennyiséget	
2020	GA ₃ oldat	80	74	47	34 (42,5%)	27
2021	GA ₃ oldat	167	157	104	73 (43,71%)	53
2022	GA ₃ oldat	98	91	57	37 (37,75%)	34
2023	Kasztrálás	108	105	86	75 (69,44%)	19

Mint látható az 1. táblázatban a 2020-2022-es években apavonalak esetében csak GA₃ oldattal dolgoztunk. Az ezt megelőző években volt példa csak kasztrálással, valamint GA₃ oldattal és kasztrálással történő génbeépítésre is, melyek sikeressége alacsony számokat mutatott. A GA₃ kezelések eredményeként kapott alacsony termékenyülési százalékok nem voltak kielégítőek, és magukkal vonták, hogy a sikertelennek bizonyult vonal indításokat/génbeépítéseket a következő szezonban újra kellett kezdeni, mely plusz munkához vezetett. Ezen okból kifolyólag nemesítőnk döntése alapján a 2023-as évben az apavonalak esetében csak kasztrálással dolgoztunk.

Az 1. táblázatban feltüntetett eredmények alapján megállapítható, hogy a kasztrálás módszere eredményesebb, és a kívánatos, növényenkénti minimum kaszat mennyiség a kasztált

növények számához viszonyítva 70%-os eredményességet adott. Ez a többi vizsgálati évben 40% körüli volt.

Évekig kétféle, 100 ppm-es és 300 ppm-es GA₃ oldatot is használtunk. A 100 ppm-es GA₃ oldat esetében azt tapasztaltuk, hogy egymást követő ismételt kezelés hatására is többször adott pollent a kezelt növény, ezért ezt a koncentrációt 2020-ban használtuk utoljára. 2021-től márcsak 300 ppm-es GA₃ oldattal (30mg GA₃/100g oldat) dolgozunk.

A gibberellines kezelések eredményei javultak a 100 ppm-es GA₃ oldatot elhagyását követően, ugyanis 2021-től nem tapasztaltuk egy esetben sem, hogy a kezelt növény pollent adott. Azonban az eredmények %-os megoszlása azt mutatja, hogy a gibberellin kezelések mindhárom évben hasonló megoszlásban eredményezték a nem megfelelő mennyiségű kaszatos és 0 kaszatos tényérok előfordulását.

A két kezelés párhuzamos alkalmazásának nagyobb volumenű kipróbálását a következő szezonban kívánjuk tesztelni. Mindkét technika alkalmazása fegyelmet, türelmet és rutint követel, de az egy növényre vetített ráfordítási időben nincs különbség.

A kasztrálás előnye, hogy igény szerint, a szezonközi megfigyelések és feljegyzések alapján, akár közvetlenül virágzás előtt álló vonalak esetén is dönthetünk a génbeépítésre való kiválasztásról és a technikát alkalmazva még az adott szezonban, egy évet spórolva kezdhetjük a munkát a vonallal. A gibberellin kezeléssel szemben mutatott eredményessége is előnyként jegyezhető. Hátránya alkalmazhatóságának szűk idő intervalluma, hiszen csak virágzaskor, a tenyészkerti munkacsúcs ideje alatt végezhető. Ez más, szintén fontos napi feladatoktól von el időt (pl. pontos virágzási idők feljegyzése, optimális időben elvégzett porszedések és keresztezések kivitelezése), melyek időbeni csúszást eredményeznek.

A gibberellin előnye, hogy már csillagbimbós állapotban tudjuk alkalmazni, a tenyészkerti munkacsúcsot megelőzően. Ebben a fenofázisban a lazább időbeosztás eredményeképpen több időt tudunk fordítani a gibberellin kezelt növények mennyiségének előállítására, melyek a hormon hatására hamarabb virágoznak; így a későbbiek folyamán, ha szükségesnek ítéljük, a megfelelő mennyiségű kaszat elérésének érdekében az adott vonalból további növények kiválasztásával és kasztrálásával kiegészíthetjük a keresztezendő növények körét. Hátránya, hogy a tapasztaltok alapján kevesebb kaszatomennyiséggel kell számoljunk növényenként, valamint, hogy a növekedés szabályozó hatására a megnyúlt növény szára jóval sérülékenyebb lesz. Az injekciós tűvel kezelt kisméretű csillagbimbón nagyobb sérüléseket okozhatunk a növénynek, melynek következtében a tényérkezdemény letörhet, illetve gyakrabban fordul elő tényérdeformitás.

Bár a kasztrálás a kaszat mennyiséget tekintve jobb eredményekkel szolgált, a

gibberellin használatával együtt tartjuk hatékonynak. Ennek oka, hogy a kétféle kezelés külön időpontban végezhető, mely megkönnyíti az előirányzott nemesítési munka egy szezonon belüli részarányos elosztását és elvégzését.

4.2. A rezisztenciagén beépítés sikerességét ellenőrző vizsgálatok eredményei

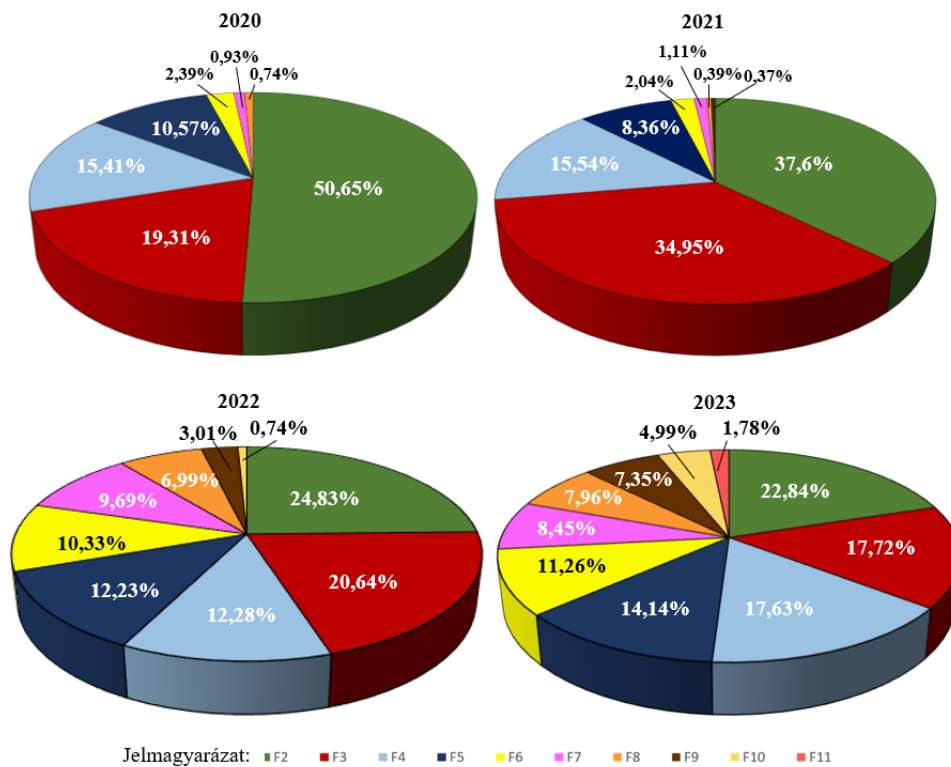
A napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztencia gén átvitel sikerességének értékeléséhez az elmúlt 3 év eredmény adatait (a 2023-ban gyűjtött minták tesztelése még csak október végén kezdődnek) vettem alapul, ugyanis 2020-tól nemesítési portfóliónkban hangsúlyos szerepet kapott a kórokozóval szembeni védelemre való nemesítés.

4.2.1. *PI6* és *PI8* rezisztencia gén detektálására elvégzett PCR vizsgálatok eredménye

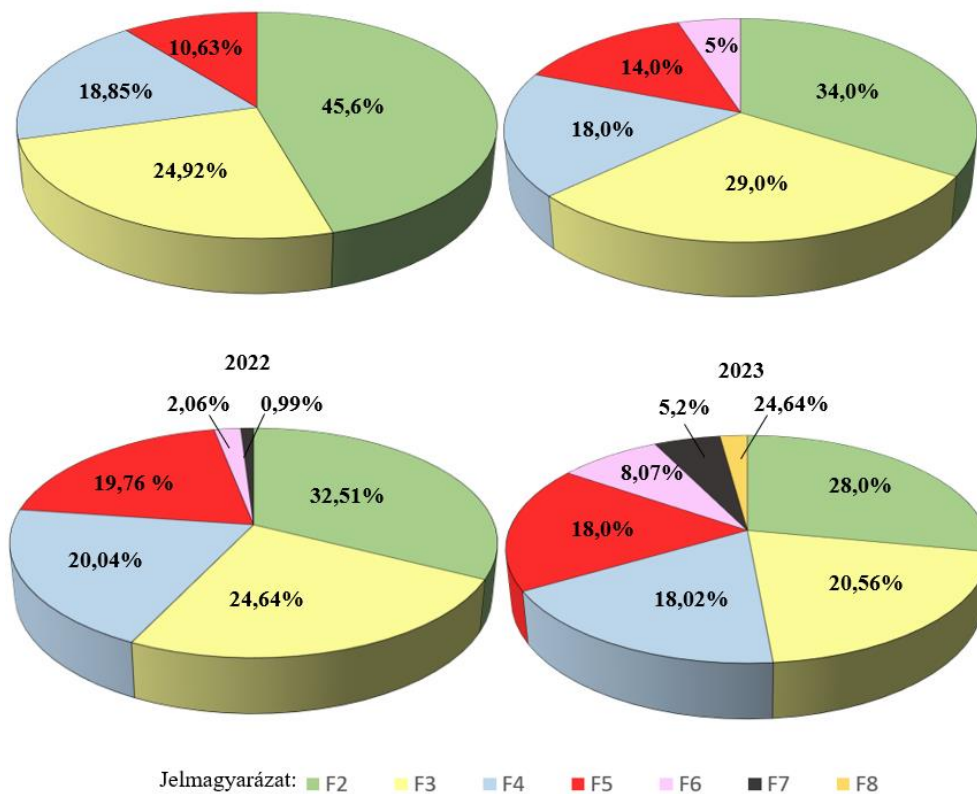
A napraforgó-peronoszpóra rezisztencia gének meglétére F2 generációtól végzünk vizsgálatokat. Az alább tárgyalt három évben összesen 3367 étkezési apa növény levélmintáján végeztünk PCR vizsgálatot, ez évente megközelítőleg 1000 megvizsgált növényt jelent.

A legnagyobb mennyiségű levélmintát az F2 generációban lévő anyagokból szedtük (10. és 11. ábra), majd a generáció növekedésével a gyűjtött mintaszám folyamatosan csökken, F5 generációtól összesen csak kettő, úgynevezett referencia levélmintát veszünk.

A F5 generációtól a vonalat homogénnek tekintjük a növényállomány magassága, habitusa, a kaszatok mérete és színe, valamint beltartalmi tulajdonságainak egyezősége alapján. A homogén állományokból gyűjtött referencia minta vizsgálati eredménye biztosítja, hogy a génbeépítésre kijelölt vonalakhoz a kívánatos rezisztencia tulajdonságokkal rendelkező donorokat válasszuk ki.



10. ábra: Pl6 rezisztencia gén vizsgálatra gyűjtött növényminták generációnkénti megoszlásban 2020-2023 között



11. ábra: Pl8 rezisztencia gén vizsgálatra gyűjtött növényminták generációnkénti megoszlásban 2020-2023 között

A táblázatokban (2. és 3. táblázat) az évenkénti váltakozó mintaszám a generációnként eltérő mennyiségű begyűjtött minta és az előző évi eredményekre alapozott szelekció eredménye.

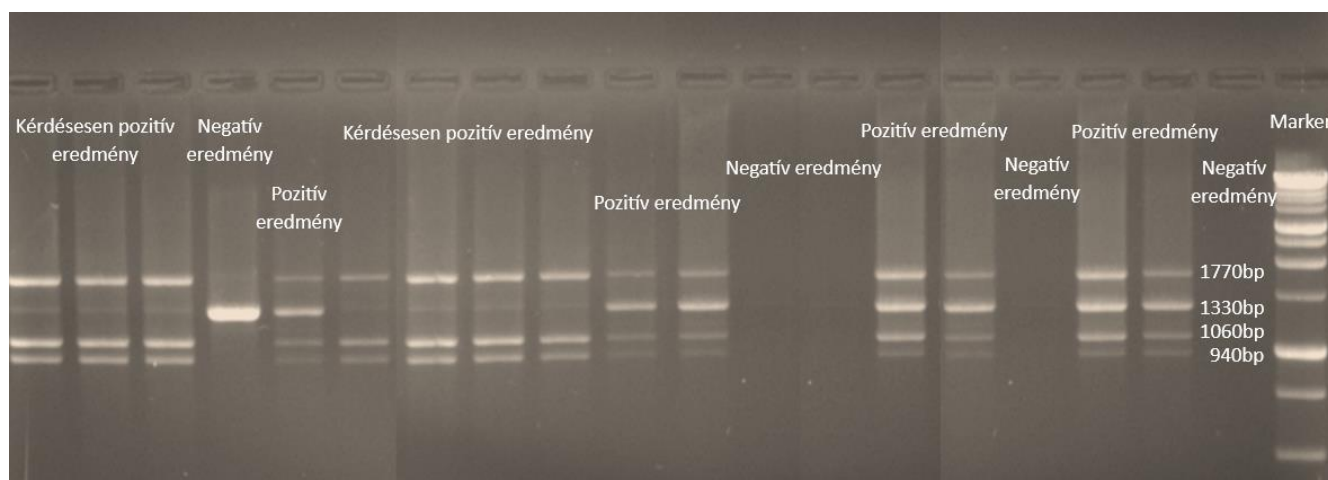
2. táblázat: *Pl6* rezisztencia gén ellenőrzésére gyűjtött minták száma és a PCR vizsgálatok összesített eredménye éves lebontásban

Vizsgálat éve	Vizsgált növények száma	<i>Pl6</i> -eredmény	<i>Pl6</i> + eredmény	Kérdéses <i>Pl6</i> + eredmény
2020	764	294 (36,95%)	423 (55,37%)	47 (6,15%)
2021	1226	218 (17,78%)	790 (64,43%)	218 (17,78%)
2022	817	391 (47,86)	396 (48,47%)	30 (3,67%)

3. táblázat: *Pl8* rezisztencia gén ellenőrzésére gyűjtött minták száma és a PCR vizsgálatok összesített eredménye éves lebontásban

Vizsgálat éve	Vizsgált növények száma	<i>Pl8</i> homozigóta (növények db száma)	<i>Pl8</i> heterozigóta (növények db száma)	<i>Pl8</i> - (növények db száma)
2020	162	31 (19,13%)	29 (17,9%)	102 (62,96%)
2021	279	99 (35,48%)	66 (23,65%)	114 (40,86%)
2022	119	32 (26,9%)	29 (24,37%)	58 (48,74%)

A gélelektroforézis után *Pl6* gént tartalmazó minták esetében 4 fragmentumot láthatunk (1720bp, 1330bp, 1060bp, 940bp). Pozitívnak tekintjük a mintát akkor, ha mind a 4 fragmentum látható (Pankovic et al. 2004; Bouzidi et al. 2002; Pankovic et al. 2007; Dimitrijevic et al. 2010). A *Pl6* rezisztenciagént nem tartalmazó (negatív) minták esetében általában csak az 1330bp hosszú fragmentum látható, esetleg egy-két más hosszúságú termék is keletkezik (12. ábra).



12. ábra *Pl6* rezisztenciagén kimutatására irányuló vizsgálat gélfotója (Fiedler András, 2022)

A legtöbb negatív eredményt minden évben a hasadó F2 generáció adja (4. és 5. táblázat). Az itteni nagyfokú, napraforgó-peronoszpóra rezisztencia génre irányuló szelekcióval jelentősen leszűkítjük a következő évre tovább vinni kívánt vonalak körét.

4. táblázat: *Pl6* rezisztencia gén éves vizsgálati eredményének generációnkénti megoszlása

Vizsgálat éve	2020			2021			2022		
Generáció	<i>Pl6</i> -	<i>Pl6</i> +	<i>Pl6</i> + ?	<i>Pl6</i> -	<i>Pl6</i> +	<i>Pl6</i> + ?	<i>Pl6</i> -	<i>Pl6</i> +	<i>Pl6</i> + ?
F2	25,92 %	29,32 %	2,23 %	6,77 %	18,52 %	5,89 %	23,77 %	13,34 %	1,10 %
F3	5,50 %	10,21 %	1,44 %	3,67 %	13,38 %	3,38 %	11,14 %	11,14 %	0,73 %
F4	3,53 %	7,46 %	1,05 %	2,20 %	8,40 %	3,59 %	3,87 %	6,85 %	0,49 %
F5	0,17 %	2,36 %	0,79 %	1,79 %	6,77 %	2,15 %	2,99 %	5,02 %	0,61 %
F6	0,92 %	2,09 %	0,52 %	1,52 %	5,22 %	1,79 %	2,55 %	4,41 %	0,37 %
F7	0,39 %	1,70 %	0,13 %	1,26 %	4,57 %	0,97 %	2,96 %	3,30 %	0,36 %
F8	0,26 %	1,31 %	0,00 %	0,35 %	4,00 %	0,00 %	0,49 %	1,97 %	0,00 %
F9	0,26 %	0,92 %	0,00 %	0,21 %	3,59 %	0,00 %	0,10 %	1,95 %	0,00 %
F10							0,00 %	0,49 %	0,00 %

5. táblázat: *Pl8* rezisztencia gén éves vizsgálati eredményének generációnkénti megoszlása

Vizsgálat éve	2020			2021			2022		
Generáció	<i>Pl8</i> hom	<i>Pl8</i> het	<i>Pl8</i> -	<i>Pl8</i> hom	<i>Pl8</i> het	<i>Pl8</i> -	<i>Pl8</i> hom	<i>Pl8</i> het	<i>Pl8</i> -
F2	9,26 %	8,02 %	39,72 %	13,98 %	7,99 %	23,25 %	9,24 %	10,24 %	24,97 %
F3	6,79 %	4,94 %	18,95 %	7,89 %	6,64 %	10,09 %	4,78 %	5,04 %	13,92 %
F4	2,47 %	3,09 %	2,89 %	5,73 %	3,99 %	3,94 %	3,42 %	4,20 %	6,08 %
F5	0,62 %	1,85 %	1,41 %	4,66 %	2,88 %	2,51 %	2,52 %	2,38 %	2,56 %
F6				3,23 %	2,16 %	1,08 %	1,66 %	1,64 %	1,20 %
F7							1,48 %	0,84 %	0,00 %

Jelmagyarázat: hom= homozigóta, het=heterozigóta

Pl6 génre irányuló vizsgálatok eredményeit összehasonlítva a gént nem tartalmazó, illetve a gént kérdésesen tartalmazó minták száma a generáció növekedésével csökken (4. és 5. táblázat). F4 generációtól a gént nem tartalmazó minták számát sikerült 4% alá szorítani, mely F8 generációra már 0,5% alá esett. Ezzel párhuzamosan F8 generációra sikerült teljesen kisselektálni a gént kérdésesen tartalmazó növényeket.

A vizsgálatok összegzéseként kijelenthető, hogy a biztosan *Pl6* gént tartalmazó, mintázott növények száma a vizsgálati évek átlagában 50% feletti és a kiegészítő provokációs tesztre szoruló növények számát is sikerült 5% alá szorítanunk (2. táblázat).

A 704-es, 714-es és 724-es *Plasmopara* patotípusok az utóbbi években jelentek meg és dominálják a hazánkban előforduló napraforgó peronoszpóra fertőzéseket (Rudolf et al. 2011; Bán et al. 2017; Virányi et al. 2015). Bár a magyar állami elismerési eljárásban ezen patotípusokkal szembeni rezisztencia jelenleg nem elismerési kritérium (http15), a nemesítőházak a *PI8* gén használatával igyekeznek védeni fajtaikat az új rasszok ellen.

Az elektroforézist követően a gélen mintánként két fragmentum jelenik meg: egy nagyobb méretű, a vizsgálat eredményességét nem befolyásoló aspecifikus termék, valamint a vizsgálat célfragmentuma, mely a DNS-létrához mérve a 100-200 bp közötti tartományban jelenik meg, közelebb a 200 bp-hoz.

A rezisztenciával kapcsolt allél az alkalmazott primerpár használatával 181 bp hosszúságú PCR-terméket, míg a fogékonysággal kapcsolt allél 189 bp hosszú PCR-terméket eredményez. Mivel a két amplikon közti különbség agaróz gélelektroforézissel nem kimutatható, ezért a nagyobb felbontást biztosító fragmentumhossz-analízis használata indokolt. A fragmentumok elválasztását nem mi végezzük, csak az eredményeket kapjuk, amiket mi értékelünk ki.

A vizsgálatok eredményeit tekintve minden vizsgálati évben 50% felett fordul elő negatív eredmény F2 generációban. Az eredmények alapján elvégzett szelekciónak köszönhetően F4 generációra a negatív minták előfordulását sikerült 50% alá, F5 generációra pedig kevesebb, mint 3% alá csökkenteni. F4 generációban a vizsgált növényekben a gén valamilyen szintű kifejeződését feljavítottuk 50%-os előfordulás fölé. Az F6 generációra a vizsgált *PI8* gént tartalmazó minták közül a gént heterogén formában hordozó növények %-os előfordulása a gént homogén formában hordozó növények előfordulásához képest lassú, stabil csökkenésbe kezdett (5.táblázat).

PI8 teszt eredmények összegezve a negatív eredménnyel rendelkező minták számát 2 éve sikerül 50% alatt tartani, míg a gén valamilyen szintű kifejeződése a korábbi években jelentkező 40% körüli értékéről 50% körüli értékre nőtt (3. táblázat).

Az évről évre elvégzett vizsgálatokkal, és az újvonal indításoknál alkalmazott *PI* rezisztencia gének használatával a repertoárunkban szereplő, ellenállósággal nem rendelkező vonalaink számának csökkenését, és ezzel párhuzamosan a valamilyen mértékű ellenállósággal

rendelkező vonalaink számának növelését is elértük: a peronoszpóra elleni rezisztencia génnel rendelkező vonalaink száma megduplázódott, az ellenállósággal nem rendelkező vonalaink száma pedig közel 20% -kal csökkent.

Az össz mintaszámhoz viszonyítva a pozitív eredménnyel zárult tesztek számát, mindhárom évre érvényes az az általános megállapítás, hogyha csak a peronoszpóra-rezisztencia gén alapján végeznénk a szelekciós munkát, a tesztelt növények 50%-át kéne kidobnunk évente.

Természetesen ez, egyéb szelekciós tényezők figyelembevételére miatt kivitelezhetetlen és jelentősen leszűkítené a vonalak közötti genetikai variabilitást.

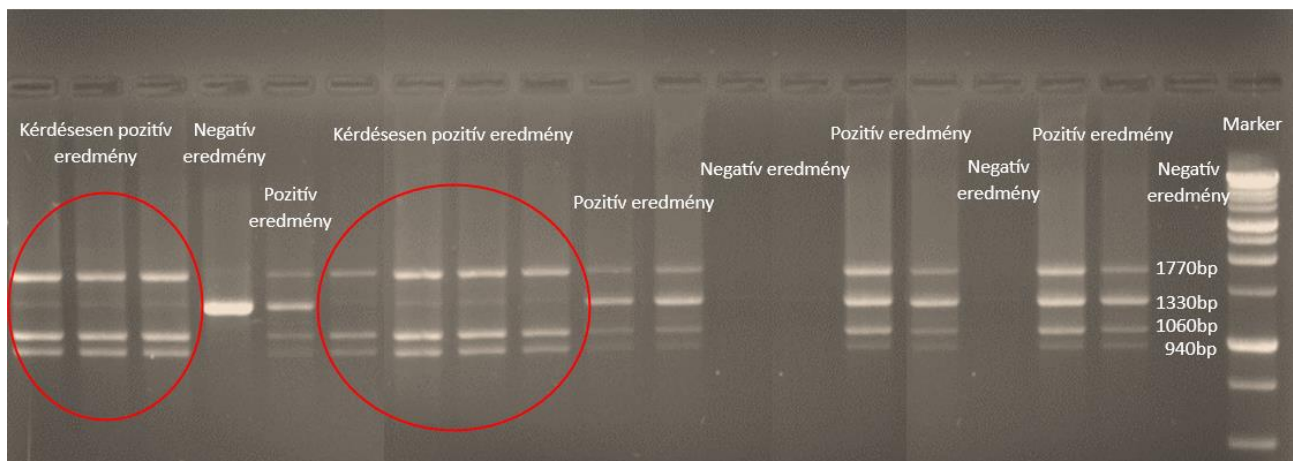
Azonban jelen eredmények nagymértékben lekorlátozzák rezisztencianemesítés egyéb szegmenseibe és hibridkeresztezési tesztekbe vonandó apavonalak számát, mellyel sok munkát, időt, de legfőképp jelentős költségeket takaríthatunk meg a jövedelmezően termeltethető, napraforgó-peronoszpóra ellenálló hibridek előállításában.

Az így megtakarított összeget új erőforrásokra, főként új peronoszpóra rezisztencia génforrások beszerzésére és még hatékonyabb vizsgálati módszerek kifejlesztésére fordíthatjuk.

4.2.2. Feltételezhetően fals pozitív eredményt adó *Pl6* minták provokációs tesztjének kiértékelése

Pl6 rezisztencia gén detektálási vizsgálatba vont apavonalak mintái közül, azokat, melyeknél a 1,5%-os agaróz gélfuttatást követően a gélfotón megkérdőjelezhető pozitív eredmény rajzolódik, provokációs kísérletbe vonunk.

A *Pl6* gént tartalmazó minták esetében 4 fragmentumot láthatunk a gélfotón. Megkérdőjelezhetően pozitív eredménynek azt tekintjük, amikor a minta 3 erősebb és egy nagyon halvány, vagy 4 nagyon halvány fragmentumot rajzol ki a gélre (13. ábra).



13. ábra: A gélfotón bekarikázott minták megkérdőjelezhető *Pl6* pozitív eredményt adtak (fotó: Fiedler András, 2022)

Ezeknek az alig látható fragmentumokat kirajzoló mintáknak a betakarított terméséből provokációs kísérletet állítunk be, melyben egy *Pl6* gént nem tartalmazó fogékony (negatív) és egy *Pl6* gént tartalmazó, azaz ellenálló (pozitív) kontroll mintához hasonlítva vizsgáljuk és értékeljük az adott minta napraforgó-peronoszpórával való fertőzöttségét. A provokációs kísérlet értékelését az ültetéstől számított 8. napon végezzük.

A HA-335/HA-336-ból származó *Pl6* rezisztencia gén véd a 100,703,710 peronoszpóra patotípussal szemben, ugyanakkor hatástalan az újabban terjedő patotípusokra (pl. 704, 714, 734) (BÁN et al. 2014a, b). Mivel azt nem tudjuk, hogy a fertőzőoldat mely patotípust, vagy patotípusokat tartalmazza (ilyen irányú tesztek a nemzetközileg használatos differenciáló fajtasor elemei nélkül egyelőre nem tudunk elvégezni), az értékelésnél döntő szerepe van a pozitív kontroll mintának.

Amennyiben a sporuláltatás eredményeként a negatív kontroll minta 100% fertőzöttséget mutat, a pozitív kontroll minta pedig egyáltalán nem fertőződött meg (14.ábra), csak azt a tesztelt növényi mintát tekintjük pozitívnak, azaz ellenállónak, melyen szintén nem jelenik meg tünet.



14. ábra: Kísérletben résztvevő vonalak fertőzöttség értékelése a negatív (balra lent) és pozitív (jobbra lent) kontroll mintákhoz viszonyítva (saját fotó, 2022)

Abban az esetben, ha a pozitív kontroll mintán fertőzöttség látható, ezen minta fertőzöttségét tekintjük a küszöbértéknek, mely alatt a mintát pozitívvá nyilvánítjuk, de nem használjuk fel donorként sem a génbeépítésekhez, sem új vonal indításokhoz.

Ugyanakkor ez a részleges megfertőződés intő jele annak, hogy az adott vonalat vissza kell helyezzük gén átviteli programunkba és a *PI6* géntől eltérő, több patotípus ellen védő rezisztencia gén beszerzését követően, az új rezisztenciagénnel való keresztezéssel biztosítsuk a kórokozóval szembeni ellenállóságot.

Az elvégzett provokációs tesztekéről általánosan elmondható, hogy a gélfotón megkérdőjelezhető pozitív eredményt adó minták az esetek 98,7%-ban minimum 70%-os fertőzöttséget mutattak, míg a pozitív kontroll minta esetében 5%-os (20-ból 1 tesztnél) előfordulással jelent meg fertőzöttség a teszt során.

5. Következtetések és értékelések

Dolgozatomat a napraforgó egyik legjelentősebb és legveszélyesebb betegségével szembeni rezisztencianemesítés témakörében írtam.

A 2010-es évek elejéig a *Pl6* gén volt a legjelentősebb *Pl* gén a kórokozóval szembeni ellenállóság biztosításában (Gulya et al. 2011; Liu et al. 2012). Étkezési napraforgó nemesítési programunkban szintén a *Pl6* gén vonalakba történő beépítésével és a kimutatására tervezett módszertan kidolgoztatásával kezdődött a betegséggel szembeni nemesítési munka.

A *Helianthus argophyllus*ból származó *Pl8*(*http3*) gén a 314-es, 704-es, 714-es, 734-et és 774-es patotípusokkal szemben is ellenállóságot mutat (Gulya et al. 2011), így véd az utóbbi években hazánkban megjelent (Rudolf et al. 2011; Bán et al. 2017; Virányi et al. 2015), a napjainkban előforduló napraforgó peronoszpóra fertőzéseket okozó patotípusokkal szemben is.

Említett rezisztencia gének beépítésére irányuló hímsteril napraforgó apavonalak előállítása során GA_3 oldatos kezelést és a kasztrálás technikát alkalmaztam. 4 vizsgálati év távlatában az a tapasztalatom, hogy az alkalmazott GA_3 oldat koncentráció a hímsteril növény előállítás sikerét befolyásolta, de a kezelések eredményeként kapott alacsony termékenyülési százalékok között nem mutatható ki szignifikáns különbség. A kasztrálás technika és a gibberellin kezelés között azonban jelentős (30%-os) különbség mutatható ki.

Bár a kasztrálás módszere eredményesebb, és a kívánatos, vonalankénti minimum kaszat mennyiség eredményesebben előállítható vele, a módszer hátránya, hogy szűk idő intervallumban, csak virágzáskor, a tenyészkeri munkacsúcs ideje alatt végezhető.

A gibberellin kezelést már csillagbimbós állapotban tudjuk alkalmazni, a tenyészkeri munkacsúcsot megelőzően.

Mindkét technika alkalmazása fegyelmet, türelmet és rutint követel, de az egy növényre vetített ráfordítási időben nincs különbség. Ezért a minőségi kasztrálás módszer és a mennyiségi gibberellin kezelés párhuzamos, kombinációs alkalmazásától azt várom, hogy az előirányzott nemesítési munkát a külön időpontban végezhető, kétféle kezelésnek köszönhetően arányaiban jobban le tudom osztani, így jobban fókuszálva az egyes feladatokra még jobb eredményeket érhetek el a hímsteril apanövények előállítása és a rezisztencia gének beépítése során.

Plasmopara halstedii változékonysága miatt különös figyelmet kell fordítani a kórokozó hazai és világszintű monitorozására, hogy követhessük az új, agresszív patotípusok terjedési útját. Továbbá mélyrehatóbban kell foglalkoznunk a kórokozó genetikai

jellemzésével, és a genetikai jellemzőit ismerve keresni az új lehetőségeket, eszközöket a betegséggel szembeni hatékony védekezésre, hogy a napraforgó megőrizze hozamának és jövedelmezőségének biztonságát.

A *Pl6* és *Pl8* gének kimutatására irányuló vizsgálataink eredménye néhány év átlagában biztatóak, de nem kielégítőek. Így továbbra is nagy figyelmet kell fordítanunk a nemesítési anyagaink peronoszpóra ellenállóságának szelekciójára.

Egyéb szelekciós tényezőket figyelmen kívül hagyva, az eredmények alapján apavonal állományunk 50%-át kéne kidobnunk, mely jelentősen leszűkítené a vonalak közötti genetikai variabilitást is.

Ezért elengedhetetlen számunka a *Pl8*-nál hatékonyabb rezisztencia génekkel (pl. *Pl35*, *Plarg*) való munka megkezdése akár egyszerre több, domináns *Pl* gén kombinálásával és a variabilitás növelése érdekében új donorvonalak beszerzése is.

Az új rezisztencia génforrások beszerzése, az újabb kísérletek beállítása és a még hatékonyabb vizsgálati módszerek kifejlesztése további anyagi ráfordítást igényelnek.

A jelenleg alkalmazott vizsgálati módszerekkel és szelekciós eljárásokkal megtakarított összeget tudnánk ezekre az új erőforrásokra fordítani, mely nagy segítség a jövedelmezően termeltethető, napraforgó-peronoszpóra ellenálló étkezési hibridek nemesítése során. Ugyanis a fogyasztói igényeket kielégítő, valamint a gazdák kultúrnövényvel szemben felállított elvárásainak megfelelő napraforgó-peronoszpóra rezisztens étkezési napraforgó hibrid előállítás a különböző rezisztenciák beépítésével járó génpiramidálás kaszatra gyakorolt negatív hatása (kaszat méretének csökkenése, íz romlása, héj-bél arány eltolódása) miatt rendkívül nehéz feladat és több generációval meghosszabbíthatja a fajtaelőállítást, mely sokkal több befektetett tőkét, türelmet, munkát és precizitást igényel.

6. Összefoglalás

Az olajnövények sorában előkelő helyet elfoglaló napraforgó igen meghatározó szerepkört tölt be szántóföldi növénytermesztésünkben. Az egyik legveszélyesebb betegsége, a napraforgó-peronoszpóra akár 100%-os termés kiesést is előidézhet a napraforgó állományban (http1; Gascuel et al. 2015).

A köztermesztésben használt legtöbb EU listás étkezési napraforgó hibrid az peronoszpóra kórokozójának új változataival, vagy a peronoszpórával szemben nem rendelkezik genetikai ellenállósággal. A betegséggel való küzdelemben a leghatékonyabb megoldásnak a *Pl* gének biztosította rezisztencianemesítés tekinthető.

Munkám során célom volt két hímsteril napraforgó előállítási technika hatékonyságának vizsgálata, továbbá a portfóliónkban szereplő apavonalakba (restorer vonalak) épített *Pl6* és *Pl8* rezisztenciagén PCR vizsgálattal történő kimutatása, a vizsgálatok eredményeire támaszkodva pedig a napraforgó-peronoszpóra rezisztens hibrid előállításba vonható apavonalak körének szűkítése.

A közel 4000 restorer növényt érintő vizsgálatokra és provokációs kísérletekre irányuló munka munkahelyem által fenntartott tenyészkertekben és laborokban valósult meg 2020 és 2023 között.

A hímsteril napraforgó előállítás hatékonyságát a megtermékenyült kaszatok mennyiségi paramétereinek vizsgálatával és az alkalmazott technika előnyeinek, illetve hátrányainak összehasonlításával értékeltem.

Megállapítottam, hogy a kasztrálás módszere eredményesebb, és a kívánatos, vonalankénti minimum kaszat mennyiség a kasztált növények számához viszonyítva 70%-os eredményességet adott szemben a gibberellines kezelések 40% -os sikerével. Bár a 100 ppm-es GA₃ oldatot elhagyását követően már nem tapasztaltuk, hogy a növényt pollent adott, a GA kezelések mindhárom évben hasonló megoszlásban eredményezték a nem megfelelő mennyiségű kaszatot vagy 0 kaszatot tartalmazó tányérok előfordulását.

A kasztrálással elérhető magasabb kaszat darabszám ellenére, a kezelések eltérő időben való alkalmazhatósága miatt a két technika párhuzamos alkalmazását tartjuk csak hatékony megoldásnak, mely megkönnyíti az előirányzott nemesítési munka egy szezonon belüli részarányos elosztását és elvégzését.

Az F2 generációtól kezdődően a rezisztencia gén átvitel sikerességének értékelése a 2020, 2021 és 2022-es vizsgálati év PCR eredményein alapul. PCR vizsgálatokat *Pl6* és *PL8* gén kimutatására végeztük a kijelölt növényeken, mely vizsgálat sikerességét agaróz

gélelektroforézissel, valamint fragmenthossz analízissel ellenőriztünk.

A vizsgálatot minden évben a hasadó F2 populációból történő levélmintagyűjtésre fókuszáljuk. Ebből adódóan a legtöbb negatív eredményt is a hasadó F2 generáció adja, ám az itt végzett napraforgó-peronoszpóra rezisztencia génre irányuló szelekcióval jelentősen leszűkítjük a következő évre tovább vinni kívánt vonalak körét. Magasabb generációban (F4, F5 és F5 fölött) a pozitív minták aránya jelentősen növekszik. A kisselektált, negatív eredményű mintáknak köszönhetően a peronoszpóra elleni rezisztencia génnel rendelkező vonalaink száma az elmúlt 3 évben megduplázódott, az ellenállósággal nem rendelkező vonalaink száma pedig közel 20% -kal csökkent.

Pl6 gén esetén a pozitív minták száma 50% feletti, és azon minták száma, melyek kiegészítő provokációs kísérletre szorulnak jelentősen lecsökkentek, jelenleg 5% alatt tartjuk őket.

A *Pl8* rezisztencia génre vizsgált növények 50%-a többnyire homogén formában hordozza az adott gént, mely 10%-kal növelte az gén átviteli eredményességünket a vizsgált időszakban. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a gén heterogén kifejeződése a gént nem tartalmazó minták százalékos megoszlásával együtt lassú csökkenésbe kezdett.

A PCR vizsgálatok pozitív eredményei (kb 50%) nagymértékben lekorlátozzák rezisztencianemesítés egyéb szegmenseibe és hibridkeresztesési tesztekbe vonandó apavonalak számát. A peronoszpóra ellenállóságra végzett szelekcióval az eredmények alapján sok munkát, időt, de legfőképp jelentős költségeket takaríthatunk meg.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Veres Anikónak, aki konzulensként elvállalta szakdolgozatom témavezetését; munkahelyemnek, a cég tulajdonosainak, valamint a vezetőség többi tagjának, hogy támogatták a szakmérnöki képzésen való részvételemet. Továbbá, hogy lehetővé tették és biztosították szakdolgozatom megírásához szükséges vizsgálati és kísérleti feltételeket.

Köszönöm kollégáimnak, fizikai dolgozóinknak és diák munkásainknak, hogy az elmúlt években segítségemre voltak a fertőzött növényi részek és levélminta gyűjtésekben, valamint a provokációs kísérletek teljes kivitelezésében és értékelésében.

Külön köszönet illeti Fiedler András kollégámat, aki a *Pl6* gén detektálására irányuló PCR vizsgálatokat végzi.

Végül, de nem utolsó sorban hatalmas köszönettel tartozom párom és családomnak, akik szeretettel és türelemmel voltak irántam a képzés és dolgozatírás során, és szüntelen biztatásukkal, olykor, ha kellett, noszogatóikkal segítették szakdolgozatom elkészülését.

8. Irodalmi jegyzék

- Bán R. (2006): Növénykórtan. Egyetemi jegyzet, Szent István Egyetem, Gödöllő, p. 28-36.
- Bán R., Égei M., Baglyas G., Zsiros N., Perczel M., Körösi K., Zalai M., Pálinkás Z., Turóczy Gy. (2017): A napraforgó-peronoszpóra: egy régi betegség új vonatkozásokkal, Agrofórum 28 (8), p. 28-30.
- Bán R., Kovács A., Baglyas G., Perczel M., Égei M., Turóczy Gy., Körösi K. (2016): Napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni) patotípusok elterjedése hazánkban. *Növényvédelem* 77 (52): p 8.
- Bán R., Kovács A., Körösi K., Perczel M., Turóczy Gy. (2014a): First report on the occurrence of a new pathotype, 714, of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) in Hungary. *Plant Disease* 98 (11): p.1580.
- Bán R., Kovács A., Körösi K., Perczel M., Turóczy Gy. (2014b): First report on the increased distribution of pathotype 704 of *Plasmopara halstedii* in Hungary. *Plant Disease* 98 (6): p. 844.1-844.1 (doi.org 10.1094/PDIS-09-13-0920-PDN).
- Békési P. (2012): A napraforgó egészségi állapotának változásai és annak okai. *Agrofórum* (49): p. 40-43.
- Benedek P. (1974): Napraforgó. In: Benedek P., Manninger S., Virányi S.(Szerk.): *Megporzás mézelő méhekkel*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 195 p., 135-153.
- Benedek P. (1983): A méhészet és a mezőgazdasági növénytermesztés. In: Nikovitz A. (Szerk.): *A méhészet kézikönyve I.-II.* Budapest: Az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóközpont és a Hungaronektár kiadása, 826 p., 577-672.
- Bíró János, 2018: Napraforgó-nemesítés jelenkori irányai és eredményei, Oldalszám: 76-78:
- Bouzidi, M. F., S. Badaoui, F. Cambon, F. Vear, D. Tourvielle D. L., P. Nicolas, and S. Mouzeyar, 2002: Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 104, 592—600.
- Dimitrijević A, Imerovski I, Miladinović D, Tancić S, Dusanić N, Jocić S and Miklič V (2010) Use of SSR markers in identification of sunflower isogenic lines in late generations of backcrossing. *Helia* 33: 191-198.

Feng J, Jan C-C, Seiler G. (2022): Breeding, production, and supply chain of confection sunflower in China. OCL 29: 11.

Frank J. (1989): A napraforgó elterjedése és termesztésének története. In: Frank J., Szabó L. (Szerk.): A napraforgó. Budapest: Akadémiai Kiadó, 413 p., 37-53.

Frank J.; Szendrő P.(szerk.) (2011): A napraforgó. Szent István Egyetemi kiadó. 93-95.,97-112.,143-147.

Gascuel Q., Martinez Y., Boniface M.-C., Vear F., Pichon M., Godiard L. The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Molecular Plant Pathology*. (2015) 16(2), 109–122

Gilley M. A., Gulya T.J., Seiler G.J., Underwood W., Hulke B.S., Misar C.G. and Markell S.G. (2020): Plant Breeding. Volume 126, Issue4.p. 440-444Plant Breeding.

Gulya Jr, T. J., Markell, S., McMullen, M., Harveson, R.M. and Osborne, L. E. (2011): Emergence of new virulent races of *Plasmopara halstedii* inciting downy mildew on sunflower in the United States [abstract]. In: North Central Division Meeting Abstracts, June 15-17, 2011, Omaha, NE. S2.3-4.

Gulya T. J. (2007): Distribution of *Plasmopara halstedii* races from sunflower around the world. Proc 2nd Int.Downy Mildew Symp. "Advances in Downy Mildew Research", Olomouc, Czech Republic, 121-134.

Gulya T. J., Virányi F., Nowell D., Serrhini M.N., Arouay K. (1996): New races of sunflower downy mildew in Europe and Afrika. Proceedings of 18th Sunflower Research Workshop, NSA, Fargo, USA, pp. 181-184.

Gulya T.J., Miller J.F., Virányi F., Stackston W.E. (1991) Proposed internationally standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. *Helia*, 14: 11-15.

Gulya, T. J., Sackston, W. E., Virányi, F., Masirevic, S. and Rashid, K. Y. (1991): New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. *J.of Phytopathol.*, 132: 303–311.

Gupta R, Chakrabarty S.K.: Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant Signal Behav.* 2013 Sep;8(9): e25504. doi: 10.4161/psb.25504

Horváth J. (szerk.), Fischl G. (1995): A szántóföldi növények betegségei. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 110-124.

Kolkman JM, Berry ST, Leon AJ, Slabaugh MB, Tang S, Gao W, Shintani DK, Burke JM, Knapp SJ: Single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium in sunflower. *Genetics*. 2007, 177 (1): 457-468.

Liu, Z., Gulya, T. J., Seiler, G. J., Vick, B. A. and Jan, C-C. (2012): Molecular mapping of the P116 downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, 125: 121–131

Maróti I., Frank J. (1989): A napraforgó külső alaktana. In: Frank J., Szabó L.(Szerk.): A napraforgó. Budapest: Akadémiai Kiadó, 413 p., 53-82.

Marshall C.M., Thompson V.L., Creux N.M., Harmer S.L. (2023): The circadian clock controls temporal and spatial patterns of floral development in sunflower. <https://doi.org/10.7554/eLife.80984> (2023.10.11.)

Nyárády A. (1958): A méhlegelő és növényei. Bukarest: Mezőgazdasági és Erdészeti Állami Könyvkiadó, 435 p.

Paládi-Kovács A. Andrásfalvy B., Balassa I., Égető M., Gráfik I., Gunda B., Kotics J., Petercsák T., Selmeczi Kovács A., Solymos E., Szabadfalvi J., Szilágyi M. (2001): Magyar Néprajz II. Gazdálkodás, Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 458-463.

Panković D., Jocić S., Lačok N., Sakač Z., Škorić D. (2004): The use of PCR-based markers in the evaluation of resistance to downy mildew in ns-breeding material. *HELIA*, 27, Nr. 40, p.p. 149-158

Panković D., Radovanović N., Jocić S., Satović Z. and Škorić D. (2007): Development of co-dominant amplified polymorphic sequence markers for resistance of sunflower to downy mildew race 730. *Plant Breeding*. Volume 126, Issue 4, p. 440-444

Pecrix Y, Penouilh-Suzette C, Muñoz S, Vear F, Godiard L. Ten Broad Spectrum Resistances to Downy Mildew Physically Mapped on the Sunflower Genome. *Front Plant Sci.*;9:1780. doi: 10.3389/fpls.2018.01780. PMID: 30564260; PMCID: PMC6288771.

Pepó P. (2005): Napraforgó. In: Antal J. (Szerk.): Növénytermesztés 2. Gyökér -és gumós növények. Hüvelyesek. Olaj- és ipari növények. Takarmánynövények. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 595 p., 224-248.p.

Pepó P. (2007): A hibridspecifikus napraforgó-termesztés néhány agrotechnikai eleme. *Agrofórum*, 18 (11) 10-14.

- Pepó P. (2010): Növénynevelés. 10. p.
- Pepó P. (2011): A napraforgó jelentősége a világon és hazánkban. *Agrofórum* 22 (11), 30-31.p.
- Pilorgé É. (2020): Sunflower in the global vegetable oil system: situation, specificities and perspectives. *OCL* 27(1):34
- Podhadszky J. (1954): A napraforgó új betegsége, a napraforgó-peronoszpóra (*Plasmopara halstedii* (Farl.Berl. Et de Toni) Magyarország. *Növénytermelés*,3:129-134.p.
- Rudolf K., Bíró J., Kovács A., Mihalovics M., Nébli L., Piszker Z., Treitz M., Végh B., Csikász T. (2011): Újabb napraforgó-peronoszpóra rász megjelenése Magyarországon, a Dél-kelet Alföldi régióban. *Növényvédelem* 47 (7): 279-286.p.
- Sackston W. E. (1981): Downy mildew of sunflower. In: Spencer, D.M. (ed.) *The Downy Mildews* Academic Press, London, UK. pp. 545-575.
- Sackston, W.E., Gulya, T.J., Miller, J.F. (1990): A proposed International system for designating races of *Plasmopara halstedii*. *Plant Disease*, 74: 721-723.
- Sedlářová M., Pospíchalová R., Drábková Trojanová Z., Bartůšek T., Slobodianová, L., Lebeda A. (2016): First report of *Plasmopara halstedii* new races 705 and 715 on sunflower from the Czech Republic– short communication. *Plant Protect. Sci.*, 52: 00–00.
- Seiler, G. J., Qi, L. L., and Marek, L. F. (2017). Utilization of sunflower crop wild relatives for cultivated sunflower improvement. *Crop Sci.* 57, 1083–1101.
- Škorić D, Seiler GJ, Zhao L, Jan CC, Miller JF, Charlet LD. (2012): Sunflower genetics and breeding: international monography. Novi Sad, Serbia: Serbian Academy of Sciences and Arts Branch, pp. 95–121
- Spring O. (2009): Transition of secondary to systemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii*—An underestimated factor in the epidemiology of the pathogen. *Fungal Ecology*. 2009; 2:75–80.
- Szabó A. (2018): Hibridspecifikus technológiai elemek a napraforgó-termesztésben. <https://agroforum.hu/szakcikkek/novenytermesztes-szakcikkek/hibridspecifikus-technologiai-elemek-a-napraforgo-termesztesben/>
- Szabó A. (2023): A napraforgó növényvédelmének kritikus pontjai, *Agrárágazat XXIV. Évfolyam VII.szám*, 54-56.p.

Szabó B., Borbély F., Szabó M., Tóth F. és Vágvölgyi S.: A fajta és a vetésidő hatása a napraforgómoly (*Homoeosoma Nebulellum* Den. et Schiff.) kártételére. *Növényvédelem*, 45. (3) 2009: 115-121.p.

Tourvieille de Labrouhe D., Gulya T. J., Masirevic S., Penaud A., Rashid K. Y., Virányi F. (2000) New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). *Proc. 15th International Sunflower Conference, Toulouse, Vol. II, I: 61-65.*

Virányi F. (1977): Napraforgó-peronoszpóra fertőzöttség kimutatása laboratóriumban. *Növényvédelem*, 13: 289-293.p.

Virányi F. (1991): A peronoszpóra-félékről általában: származásuk, élettani és genetikai sajátosságaik, specializációjuk. *Növényvédelem*, 27 (10): 467.p.

Virányi F. And Spring O. (2011): Advances in sunflower downy mildew research. *Eur. J. Plant Pathology*, 129: 207-220.p.

Virányi F., Gulya T.J. and Tourvieille de Labrouhe D. (2015): Recent Changes in the Pathogenic Variability of *Plasmopara Halstedii* (Sunflower Downy Mildew) Populations from Different Continents, *Helia*, 38(63), p.149-162

Vrânceanu A. V. (1977): A napraforgó. (Ford.) Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, p.9-285.

Zimmer D.E. (1974) Physiological specialisation between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. *Phytopathology*, 64: p.1464-1467.

Zsiros N. (2015): Indukált rezisztencia a napraforgó-peronoszpórával szemben. [szakdolgozat]Gödöllő: Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezetgazdálkodási agrármérnöki BA. 3-12.p.

Internetes hivatkozások:

http1 <https://www.agroinform.hu/szantofold/genetikai-vedelemmel-a-napraforgo-termesenek-maximalizalasaert-66849-001> (2023.10.02)

http2 <https://agroforum.hu/szaccikkek/novenytermesztes-szaccikkek/hibridspecifikus-technologiai-elemek-a-napraforgo-termesztesben/> (2022.10.03)

http3 <https://www.ag.ndsu.edu/fss/ndsu-varieties/fact-sheets-and-brochures/HA458toHA460.pdf> (2023.10.01)

- http4 <https://genezispartner.hu/novenykulturak/szantofoldi-novenyek/napraforgo/>
(2023.02.17)
- http5 <https://www.agiboo.com/sunflower-oil/> (2023.08.21)
- http6 <https://www.yara.hu/tapanyagellatas/napraforgo/termesztesenek-jelentsege/>
(2023.09.12)
- http7
https://www.nive.hu/Downloads/Szakkepzesi_dokumentumok/Bemeneti_kompetenciak_meresi_ertekelesi_eszkozrendszerenek_kialakitasa/20_2203_019_101030.pdf (2023.08.21.)
- http8 <https://www.cbi.eu/market-information/grains-pulses-oilseeds/sunflower-seeds/market-potential> (2023.10.08)
- http9 http://nttt.mkk.szie.hu/oktatas/jegyzet/jegyzet_nf.pdf (oktatási jegyzet) (2022.12.14)
- http10 <https://www.agronaplo.hu/szakfolyoirat/2008/03/szantofold/a-napraforgo-regi-uj-betegsegeirol> (2023.07.09)
- http11 <https://agraragazat.hu/hir/kortani-erdekessegek-a-napraforgoban/> (2023.08.25)
- http12 <http://www.plantbreeders.hu/a-novenynemesitesrol/tortenete-hazankban> (2023.09.17)
- http 13 <https://cshprotocols.cshlp.org/content/2012/3/pdb.rec068742.full?rss=1> (2023.10.31.)
- http14 <https://www.nak.hu/tajekoztatasi-szolgalatas/mezogazdasagi-termeles/101828-a-napraforgo-peronoszpora-betegsege> (2023.10.16)
- http15 <https://www.biokutatas.hu/hu/page/show/napraforgo-fajtahaszalat> (2023.09.17)

9. Mellékletek

1. melléklet: Pufferek elkészítése

1.1. melléklet: 50ml térfogatnyi TE puffer elkészítéséhez szükséges hozzávalók:

500 µl Tris + 100 µl 0,5 M EDTA + 49,4 ml desztillált víz

1.2. melléklet: 1liter 1xTAE puffer elkészítésének hozzávalói:

20ml 50xTAE + 980ml desztillált víz

2. melléklet: alkalmazott Primerek szekenciája

2.1. melléklet: P16 gén detektálásánál használt HaP3 marker szekvenciája

HaP3 forward GTTTGTGGATCATCTCTATGCG

HaP3 reverz TGCTTCTTCCTTCTATCTCACTC

2.2. melléklet: P18 gén detektálásánál használt ORS 316 marker szekvenciája

ORS 316F TGGCGTCTTCATAGCATCAG

ORS 316R GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC

10. Hallgatói nyilatkozat

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Zsiros Noémi

A Hallgató Neptun kódja: IVK8QO

A dolgozat címe: Étkezési napraforgó apavonalak napraforgó-peronoszpórával szembeni rezisztencianemesítése

A megjelenés éve: 2023

A konzulens intézetének neve: Genetika és Biotechnológia Intézet

A konzulens tanszékének a neve: Genetika és Genomika Tanszék

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

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan 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 szellemitulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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

- nem titkosított dolgozat a védést követően

- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2023. év november hó 08. nap



Hallgató aláírása

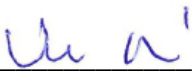
11. Konzulensi nyilatkozat

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

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

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

Kelt: 2023. év november hó 10. nap



Belső konzulens