



## **INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA**

**2024. május 24.**

# **A KÍNAI KEL NARANCSSÁRGA MUTÁCIÓJÁNAK ÁTVITELE KÁPOSZTAFÉLÉKBE EMBRYO-RESCUE MÓDSZERREL**

**Introduction of Chinese cabbage's orange mutation into Brassica oleracea using  
embryo-rescue**

**Készítette:** **Tari Erika Anett,**  
C5US5B  
Agrármérnök osztatlan szak  
nappali tagozat  
Szent István Campus

**Témavezetők:** Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kitty, egyetemi  
adjunktus, Genetika és Biotechnológia Intézet,  
Genetika és Genomika Tanszék  
Dr. Galli Zsolt, Brassica nemesítő, Syngenta Kft.  
Czinege Dóra, nemesítő asszisztens, Syngenta  
Kft.

**Gödöllő  
2024**

# Tartalom

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tartalom.....                                                                                                         | 2  |
| 1. Bevezetés.....                                                                                                     | 4  |
| 2. Célkitűzés .....                                                                                                   | 5  |
| 3. Irodalmi áttekintés .....                                                                                          | 6  |
| 3.1. A káposztafélék nemesítése .....                                                                                 | 6  |
| 3.2. A karotinoid vegyületek bemutatása és jellemzése .....                                                           | 7  |
| 3.3. A <i>Brassica. rapa</i> -ban azonosított számunkra fontos recesszív mutáns gén bemutatása és jellemzése .....    | 8  |
| 3.3.1. A kínai kel fenotípusos összehasonlítása Lee és munkatársai alapján.....                                       | 8  |
| 3.3.2. A kínai kel karotinoid összetétele .....                                                                       | 9  |
| 3.4. Nemesítési célkitűzés és a megvalósításának lépései.....                                                         | 10 |
| 3.5. Markerekre alapozott szelekció (MAS) bemutatása .....                                                            | 11 |
| 3.5.1. Molekuláris markerek jellemzése .....                                                                          | 12 |
| 3.5.2. A PCR és a touchdown PCR.....                                                                                  | 13 |
| 3.6. A Bra-OR primerpárok használata a narancssárga mutáció kimutatására .....                                        | 13 |
| 3.7. COS (Conserved Ortholog Set) .....                                                                               | 14 |
| 3.8. A vernalizáció és az embriómentés, vagyis az interspecifikus hibridizáció sikerességét elősegítő technikák ..... | 14 |
| 3.8.1. A vernalizáció.....                                                                                            | 14 |
| 3.8.2. Az embriómentés.....                                                                                           | 14 |
| 3.9. Növényi mikroszaporítás .....                                                                                    | 15 |
| 3.9.1. <i>B. oleracea</i> in vitro mikroszaporítása .....                                                             | 17 |
| 3. 10. Flow citometria.....                                                                                           | 17 |
| 4. Anyagok és módszerek.....                                                                                          | 19 |
| 4.1. Felhasznált növényanyagok a keresztezésben .....                                                                 | 19 |
| 4.2. Embriómentés .....                                                                                               | 20 |
| 4.3. A DNS alapú vizsgálatok.....                                                                                     | 22 |
| 4.4. Flow citometria .....                                                                                            | 23 |
| 5. Eredmények és értékelésük .....                                                                                    | 26 |
| 5.1. Az embriómentés eredményei a BC4 generációnál .....                                                              | 26 |
| 5.2. PCR eredmények molekuláris vizsgálatoknál .....                                                                  | 28 |
| 5.2.1. Bra-OR primerpár .....                                                                                         | 28 |
| 5.2.2. COS markerek primerpárjaival elért eredmények.....                                                             | 29 |
| 5.3. In vitro kultúrában tartott BC <sub>3</sub> hibrid növények eredményei.....                                      | 31 |
| 5.4. Flow citometria eredményeink .....                                                                               | 32 |
| 6. Összefoglalás .....                                                                                                | 34 |

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>7. Irodalomjegyzék .....</b>    | <b>36</b> |
| <b>8. Mellékletek .....</b>        | <b>39</b> |
| <b>9. Köszönetnyilvánítás.....</b> | <b>45</b> |

# 1. Bevezetés

A káposztafélék a világ zöldségtermesztésének 10 %-át teszik ki, így a harmadik helyet foglalják el a paprika és a paradicsom után. A keresztesvirágú növényekben megtalálható vegyületek közé tartozik a szulforán, aminek jótékony hatása, hogy csökkenti a rák kialakulásának esélyét, ezek mellett gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatása is ismer (Donaldson 2024).

Napjainkban a funkcionális élelmiszerek a bennük megtalálható különböző vegyületek egészségmegőrző szerepe miatt fontosak lettek a fogyasztók körében. Ezek a szuper élelmiszerek számos - nem csak a standard étel által hordozott tápanyagokat - halmozzák fel. Több és választékosabb vitaminokat, ásványi anyagokat és rostokat tartalmaznak, illetve antioxidánsokat is találhatunk meg bennük. Ehhez a trendhez alkalmazkodva a nemesítők az utóbbi évtizedekben több új színes zöldségféléket állítottak elő.

A karotinoidok - másodlagos anyagcseretermékek - fontos szerepük van az immunrendszer normál működésének fenntartásában, valamint csökkentheti a szív- és érrendszeri problémákat, fenntarthatja a normál látást és csökkentheti némely rákos elváltozás kialakulásának kockázatát is humán vonatkozásban.

A narancssárga belsőlevelű fejes káposzta nemesítése Dr. Galli Zsolt káposztanemesítő nevéhez fűződik. Elképzelése egy olyan fejes káposzta, mely belső leveleiben narancs színt halmoz fel. Első megközelítésben a káposztát narancssárga karfiollal keresztezte, mindkét növény egy fajba tartozik. Ez a nemesítés nem adta a várt eredményt, mivel a torzsában koncentrált a narancsszín nagyobb mennyiségben, nem a levelekben. Második megközelítésben a narancssárga kínai kelnek (*B. rapa*) egy genotípusát keresztezték káposztafélékkel, - ezek közül a karalábéval (*B. oleracea*) való keresztezés hozott eredményt - ahol az introgresszió sikeresnek bizonyult, és egy steril F1 növényt eredményezett. A célkitűzés megvalósításához szükséges volt az embriómentés technika alkalmazása. Az F1 hibrid egyed steril egyed volt, 4 éves vegetatív szaporítás után feltételezhetően spontán endomitózis révén, egy fertilis oldalhajtás jelent meg rajta. Ezután a fertíl F1 növénnel megkezdték a korai visszakeresztezéseket Bridge növényekkel (ezek átmenetet képeznek mind fenotípusosan mind genotípusosan *B. rapa* és *B. oleracea* között). Jelenleg a BC<sub>3</sub> növények anyai partnerként szerepelnek a keresztezésekben.

## 2. Célkitűzés

Célkitűzéseink a következők:

- A BC<sub>4</sub> keresztezésből származó magkezdemények esetén embryo-rescue alkalmazása.
- A BC<sub>3</sub> egyedek DNS alapú vizsgálata, hogy megállapítsuk, hogy hordozzák-e a narancs mutáns gént, illetve hogy a választott COS markerekkel a *B. rapa*, vagy *B. oleracea* specifikus fragmentumot adják-e.
- A 12 BC<sub>3</sub> egyed *in vitro* kultúrába bevitele/fenntartása.
- A BC<sub>3</sub> egyedek flow citometriás vizsgálata, hogy meghatározzuk a relatív genomméretüket.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. A káposztafélék nemesítése

A világ zöldségtermesztésének és az étolaj termelésének - a repce termesztése - egyaránt jelentős részét képviselik, ráadásul ígéretes potenciált hordoznak bioüzemanyagként is (Gupta & Pratap, 2007). Globálisan a káposztafélék vetésterülete 1977 óta emelkedik. 2022-ben a káposztát mintegy 147 országban termesztettek, melynek az éves termés mennyisége több, mint 78 millió tonna növényt eredményezett. Fő termő területei az ázsiai kontinensen találhatók meg. Első helyen Kína szerepel, mely közel az összes termesztés 50%-át teszi ki, ezután India és Dél-Korea következik. Európai országok közül Olaszország termel nagyobb területen. Hazánk közel 1900 hektár termőterületen 52 ezer tonna káposztát állított elő 2022-ben (<http1>).

A káposztafélék nemesítése során számos tulajdonságot fontos figyelembe venni, például a jó minőségű vetőmag előállítását, ideális fajták kifejlesztését (mint például a termőképesség, korai érés, kedvezőtlen tulajdonságoktól való mentesség, betakaríthatóság, szállíthatóság, tárolhatóság stb.), valamint a betegségekkel és kártevőkkel szembeni rezisztencia kialakítását rezisztenciagének alkalmazásával. Emellett kiemelt figyelmet fordítanak a fogyasztók és kereskedők számára fontos tulajdonságok kialakítására, mint például az íz, szín és forma (Galli, 2020, szóbeli közlés). Az abiotikus stressz tényezők, mint például a magas hőmérséklet és szárazság, elleni tolerancia kialakítása is növekvő jelentőséggel bír a klímaváltozás miatt, mivel ezek együttes alkalmazása jelentősen csökkentheti a termésvesztést, ami gazdasági szempontból legfontosabb a termelők számára a piacon maradás miatt. (<http2>).

A káposztafélék ivaros keresztezése és szomatikus hibridizációja révén létrehozott távoli hibridjei nemcsak a génkészlet bővítését szolgálták, hanem segítettek a klímaváltozás miatt fellépő abiotikus és biotikus hatások okozta károk leküzdését is (Gautam et al., 2014). Az elmúlt 70 év során számos vad *Brassicaceae* faj genotípusát használták fel távoli keresztezésekben, mivel ezek számos kedvező agronómiai tulajdonsággal rendelkeznek, amelyeket nemesítési célokra alkalmaznak (Prakash et al. 2009).

A fejes káposzta (*B. oleracea* – CC) esetében három fő felhasználási célt különböztetünk meg. Az egyik a friss piaci káposzta, mely 0,7-3 kg fejtömeggel rendelkezik. Következő csoport a feldolgozóipari, mely 6-10 kg. Az utolsó a tárolási káposzta, ami 2,5-4 kg

tömegű. Az egyes csoportokban lévő növények mérete és külső megjelenése eltérő, valamint a tenyészidő hossza is növekszik a friss piactól a tárolási káposzta irányába. A megfelelő fejtömeg mellett a fejes káposzta esetében a fej alakja is fő nézőpont a különböző felhasználási célok szempontjából (Galli, 2020, szóbeli közlés). Így a nemesítés nem csak a funkcionális élelmiszer irányába történik, hanem fontos figyelembe venni, hogy a káposzta könnyen betakarítható legyen, valamint ellenálló legyen egyes betegségekkel szemben, és jó legyen a stressz tűrő képessége is.

### ***3.2. A karotinoid vegyületek bemutatása és jellemzése***

A karotinoidok a természetben előforduló színes vegyületek. Leggyakrabban sárga, narancssárga vagy vörös színben vannak jelen főként a magasabb rendű növények különféle szöveteiben, például virágszirmokban, gyümölcsökben, levelekben és terméseken. A növények számára nem csak a fotoszintézisben van nagy szerepük, hanem a rovarok általi beporzást is segíti, mivel a sárga szín egy csalogató szín a természetben. (Chernys & Zeevaart, 2000). Izoprénből eredeztethetőek a színes pigmentek, melyek zsírolékonyak és általában konjugált kettős kötések tartalmazzák, ami azt eredményezi, hogy rendkívül reakcióképes vegyületek. Egyik fő csoportjuk a karotinoid-szénhidrogének, ide tartozik a likopin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -karotinok. Másik egység az oxigéntartalmú karotinoidok, más néven xantofilok, mint például kriptoxantin, zeaxantin, xantofill és rubixantin. (Csapó & Csapóné, 2003).

Könnyen reakcióba lépő vegyületek, emiatt a kémiai tulajdonságuk miatt nélkülözhetetlenek vegyületek minden olyan szervezet számára, mely fotoszintézisre képes. A xantofilok fordulnak elő kiegészítő pigmentként a kloroplasztizok fénygyűjtő komplexekben, amelyek feladata a fotoszintézisben, hogy segítik az energiát a klorofill molekulákhoz eljuttatni. Ezenkívül erős fényvédő pigmentek, vagyis magas fényviszonyok esetén a karotinoidok eloszlatják a felesleges gerjesztési energiát. Ez az energia károsíthatná a klorofill molekulákat és csökkenthetné a fotoszintézis hatékonyságát (Niyogi, 1999).

A  $\beta$ -karotin a karotinoidok között a leggyakoribb és legjobban tanulmányozott vegyület, mivel nemcsak a növényi szövetek színét alakítja ki, hanem számos pozitív egészségügyi hatással is rendelkezik az emberi szervezetre. A  $\beta$ -karotin a legpotensebb provitamin a A-vitamin szintézisében, így ez a fő A-vitaminforrás az emberi szervezetben, és antioxidánsként is rendkívül hatékony. Emellett csökkenti a szívbetegségek és bizonyos rákos megbetegedések

kockázatát, erősíti az immunrendszert, és fontos szerepet játszik az öregedéssel járó vakság megelőzésében is (Gul et al., 2015). Hiánya szemszárazsághoz (xeroftalmia), vaksághoz és akár korai halálhoz is vezethet. Mivel zsírban oldódó vitaminról van szó, a túlzott bevitel lehetséges, ezért ajánlott a növényi táplálékokból történő bevitele, melyet a szervezet A-vitaminná alakít át az igényeknek megfelelően (Mayne, 1996).

### **3.3. A *Brassica. rapa*-ban azonosított számunkra fontos recesszív mutáns gén bemutatása és jellemzése**

A kínai kel (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), más néven pekingi káposzta, Japánban rendkívül elterjedt és gyakran fogyasztott zöldség, melyet magas C-vitamin- és ásványianyagtartalma tesz vonzóvá a fogyasztók körében (Podsedek, 2007). Kínában és Koreában, mint a legjelentősebb levélzöldség termesztik. Koreában a kimchi, egyik nemzeti étel alapanyaga a ez a zöldségféle, így gyakran kimchi kel néven beszélnek róla az országban (Schmidt & Bancroft, 2011).

#### 3.3.1. A kínai kel fenotípusos összehasonlítása Lee és munkatársai alapján

A belső levelek színének alapján három különböző fenotípust lehet megkülönböztetni: a normál színű belső levelekkel rendelkezőt (NC - normal colored), a citromsárga belső leveleket mutatót (YE - yellow colored) és a narancssárga belső levelekkel rendelkezőt (OC - orange colored) (Feng et al., 2012). Az OC fenotípus létrehozásához a tarlórépát (*Brassica rapa* subsp. *rapa*) és az NC fenotípust keresztezték, majd többszöri visszakeresztezés során hozták létre azt a kínai kelt, mely narancssárga levelekkel rendelkezik (Watanabe et al., 2011).

Lee és munkatársai összehasonlították az narancs és sárga fenotípusok belső leveleinek színét, és azt tapasztalták, hogy az OC esetében a belső levelek erősebben sárga vagy halvány narancssárga színűek voltak, míg a YE fajtára jellemzőek a citromsárga belső levelek. Öt perc direkt napsugárzás hatására az OC levelek színe még élénkebb narancssárga lett, míg a YE fenotípus leveleinek ugyan olyan színűek maradtak. Ezt a jelenséget az UV sugárzás hatásának tulajdonították. Emellett a virágszínek között is különbségeket véltek felfedezni, miszerint a YE esetében élénk citromsárga színű szirmok vannak, míg az OC esetében a szín kevésbé élénk sárga volt (2. ábra) (Lee et al. 2014).



2. ábra: A YE és OC fenotípusok összehasonlítása (Lee et al. 2014)

(Pongrácz 2021)

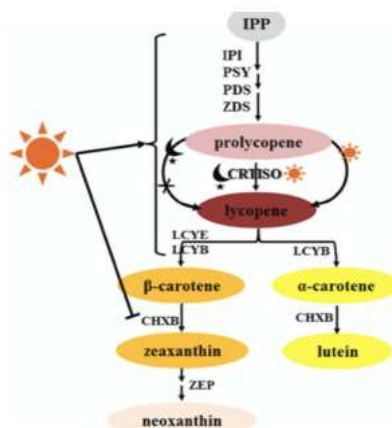
Az NC *B. rapa*-nál - mely AA genommal rendelkezik - már 1996-ban megállapították, hogy a lutein és a  $\beta$ -karotin a fő karotinoid komponensei (Wills & Ranga, 1996). Később más *Brassica* fajoknál, mint például a fejes és vörös káposzta, brokkoli, kelkáposzta, karfiol, kelbimbó karotinoid összetételét is vizsgálat alá vetették, ahol szintén ugyanezt a két vegyületet detektálták a legnagyobb mennyiségben (Podsedeck, 2007).

### 3.3.2. A kínai kel karotinoid összetétele

A narancssárga kínai kel (AA) karotinoid összetételét 2011-ben Watanabe és munkatársai jegyezték fel. Egy narancssárga belső levelű fajtát (Orange queen) használtak vizsgálatuk folyamán. Ezen folyamat esetében a teljes káposztafej karotinoid összetétele a következő volt: 48% prolikopin (7Z, 9Z, 7'Z, 9'Z tetra-cisz-likopin), 29% fitoén és 23%  $\beta$ -karotin, míg az össz-karotinoid tartalma kétszer akkora volt, mint egy normál fenotípusú kínai kelnek (Watanabe et al., 2011).

A prolikopin szájon át történő felszívódási aránya magasabb, mint az össz-transz-likopiné, vagyis a narancssárga belső levelű fenotípusban megtalálható narancssárga pigmentek nagyobb *in vivo* aktivitással rendelkeznek - például antioxidáns aktivitással - mint a normál fenotípusban jelen lévő vegyületek (Unlu et al., 2007).

Su et al (2015) közölte le, hogy a mutáns allél promóterében egy 90 bp mértű delécia van a vad típusú allélhez képest, illetve, hogy a gén 3' végén, a STOP kodontól upstream irányban egy 501 bp méretű inszerciót hordoz, így a fehérje C-terminális végéhez plusz 143 aminosav adódik hozzá, illetve több további SNP-t is azonosítottak. Az *in vitro* enzimvizsgálatok bizonyították, hogy a mutáns fehérjetermék (CRTISO enzim hiánya) nem képes a prolikopint likopinná alakítani, ami prolikopin felhalmozódáshoz vezet a narancssárga belső levelű kínai kel fajtákban (Su et al. 2015) (3. ábra). A  $\beta$ -karotin bioszintézisének utolsó köztése a likopin; a  $\beta$ -karotin gyűrűképzéssel (ciklizáció) jön létre ebből a molekulából (Gubicskóné Dr. Kisbenedek 2015).



3. ábra. A narancsszínű belső levelek kialakulásának útja kínai kel esetén (Su et al. 2015).

### 3.4. Nemesítési célkitűzés és a megvalósításának lépései

A nemesítési célként tűzte ki Dr. Galli Zsolt egy olyan fejes káposzta létrehozását, amelynek belső leveleiben  $\beta$ -karotin halmozódik fel. Egy ilyen növény étrendünkbe illesztése hozzájárulhat egy egészségesebb életmód kialakításához. Első megközelítésben a karfiolban azonosított narancs mutáns gén (Crisp et al. 1975) átvitele történt meg káposztába, mivel egy fajba tartoznak (karfiol, karalábé), így könnyen keresztezhetőek ivaroson. Azonban a keresztezésből származó növények a gazdaságilag hasznos levelekben csekély, míg a torzsában nagy mennyiségű karotint halmoztak fel (Pongrácz 2021) (4-5. ábra).



4. ábra. Fejes káposzta belső levelei (Fotó: Galli Zsolt) (Pongrácz 2021)



5. ábra. A karfiol mutáns Or génjét tartalmazó fejes káposzta (B)  $\beta$ -karotin felhalmozása a torzsában (Fotó: Galli Zsolt) (Pongrácz 2021)

Második megközelítésben a narancs kínai kelben (*B. rapa*) azonosított recesszív mutáns CRTISO1 génnel próbálták megvalósítani a kívánt célt. Mivel a kínai kel (*B. rapa*) A genommal, a fejes káposzta (*B. oleracea*) C genommal rendelkezik, így az F1 hibrid előállításnál embriómentés módszer alkalmazása elengedhetetlen volt az abortáció miatt. Mivel klasszikus keresztezéssel létrehozott belső leveleiben narancssárga fejes káposzta előállítása a cél, így a létrehozott fajta könnyen beilleszthető a génmódosított növények termesztését szigorúan korlátozó országok termesztésbe is. Több kijelölt ivarosán végzett introgressziós keresztezésből egy hibridet (orankin x karalábé) kaptunk, ami hímsterilnek bizonyult, így nem tudtunk öntermékenyíteni és magot fogni róla, de 4 év vegetatív szaporítás során megjelent rajta egy fertilis oldalhajtás, ami leszaporításra került. Ez lett a fertil F1 növényünk. A korai visszakereszteзések során Bridge növényeket használtunk fel. Ezek a Bridge növények mind fenotípusos tulajdonságaikban, átmenetet képeznek a *B. rapa* és *B. oleracea* között, így könnyen keresztezhetőek azok hibrideivel.

### **3.5. Markerekre alapozott szelekció (MAS) bemutatása**

Fő célja a növénynemesítésnek az új fajták kifejlesztése, melyek kiemelkedő gazdasági tulajdonságokkal rendelkeznek, ez lehet klimatikus tényezőkkel szembeni tolerancia, például a szárazságtűrés, illetve kórokozókkal szembeni rezisztencia. Ezzel a tulajdonságukkal, ha sikerül megvalósítani, akkor képesek felülmúlni a korábbi fajtákat. Az egyik módszer a siker eléréséhez, ha a szülőket szelektáljuk, majd a kiválasztott egyedeket keresztezzük. Az így kapott F2-es populációból az olyan egyedek kiválasztjuk, amelyek fontos géneket hordoznak, és ezek többszöri visszakereszteзése (backcrossing = BC) történik meg. Ennek eredményeként végül olyan fajtát kapunk, amely a gazdasági hasznos gént tartalmazza. A markerekre alapozott szelekció (Marker Assisted Selection) a növénynemesítésben a molekuláris markerek felhasználását jelenti, amelyek javítják a szelekció hatékonyságát (Acquaah 2012).

A molekuláris markerek az egész nemesítési folyamatban alkalmazhatók, ami az első lépéstől, vagyis a szülői vonalak szelekciójától kezdve egészen a visszakereszteзésekig és a fajtajelleg nyomkövetéséig tart. A markerek alkalmazása sok előnnyel jár a hagyományos fenotípusos szelekcióval szemben:

- Kodomináns markerek esetén könnyen meg lehet különböztetni a homozigóta és a heterozigóta egyedeket.

- Korai szelekciót tesz lehetővé, ami felgyorsítja a nemesítési folyamatot.
- "Kényelmes szelekciót" biztosít, ami legfőképpen a biotikus stresszfaktorokkal szembeni rezisztencia tesztelésekor fontos tulajdonság.
- Csökkenti a nemesítés térigényét, mivel a nemkívánatos egyedek már a kiültetés előtt kiszelektálhatók, még a csírákban.
- Csökkenti a nemesítés időtartamát, mivel a korai tesztelés és egyszerű szűrés felgyorsítja a folyamatot (Acquaah 2012).

### 3.5.1. Molekuláris markerek jellemzése

Ezek a molekuláris markerek olyan polimorf DNS szakaszok, amelyek pozíciója meghatározható a kromoszómán és a mendeli öröklésmentet követik. A molekuláris markerek elhelyezkedhetnek a kódoló vagy nem kódoló régiókban elhelyezkedők. Ideális esetben a molekuláris markerek a következő tulajdonságokkal rendelkeznek:

- Nagyfokú polimorfizmust mutatnak és kodomináns öröklésmentet követnek.
- Gyakran megtalálhatóak a genomban és könnyen hozzá is férhetőek.
- Gyors és egyszerű vizsgálatot tesznek lehetővé.
- A vizsgálat során nyert adatok könnyen reprodukálhatók és kicserélhetők laboratóriumok között (Kiss 2005).

Ezeket a markereket genetikai jellegzetességeik alapján két fő csoportba sorolhatjuk. Egyik csoportjukba az egy lókuszos, multi-allélos, kodomináns markerek sorolhatóak. Ilyen például SSR (egyszerű ismétlődő szakaszok). Másik csoportba a multi-lókuszos, bi-allélos, domináns markerek, például AFLP (amplifikált fragment hosszú polimorfia) és RAPD (véletlenszerű amplifikált polimorf DNS).

A molekuláris markerek detektálási technikák szerint lehetnek enzim-alapúak, hibridizáció-alapúak, PCR technikán alapulóak és DNS szekvencia-alapúak. A PCR technika az egyik leggyakrabban alkalmazott módszer, mivel gyors, érzékeny és könnyen reprodukálható.

### 3.5.2. A PCR és a touchdown PCR

A polimeráz láncreakció (PCR) egy olyan módszer, amely lehetővé teszi a nukleinsav-szekvenciák gyors és hatékony felszaporítását. Ez a technika 1995 óta ismert, a természetes DNS replikációs folyamat alapelvein alapul, és lehetővé teszi, hogy egy DNS-templátból több millió másolatot állítsunk elő. A PCR reakcióhoz szükségesek a DNS-templát, a DNS-polimeráz, a nukleotidok és a primerek, amelyek a DNS-polimeráz működéséhez szükségesek. A reakció során a DNS-templát kettős szálát elválasztjuk (denaturáció), majd a primer-molekulákhoz (annealing) kapcsolódik a DNS-polimeráz, és a nukleotidok felhasználásával új DNS-szál szintetizálódik (szintézis).

A touchdown PCR egy olyan módszer, amely lehetővé teszi a PCR reakciók hatékonyságának optimalizálását anélkül, hogy hosszú optimalizálási folyamatokra vagy új primer-tervezésre lenne szükség. Ez a technika a primerkapcsolódási hőmérséklet (annealing temperature) fokozatos csökkentésén alapul a ciklusok során. A reakció kezdetén a primerkapcsolódási hőmérséklet magasabb a primer olvadási hőmérsékleténél ( $T_m$ ), majd a ciklusok során fokozatosan csökken, ami segít a specifikus DNS-termékek amplifikációjában. Ez növeli a reakció specifitását, érzékenységét és hozamát anélkül, hogy bonyolult optimalizációs lépésekre lenne szükség (Korbie & Mattick 2008).

### **3.6. A Bra-OR primerpárok használata a narancssárga mutáció kimutatására**

A mutáns BrCRTISO1 allél jelenlétét a Lee és munkatársai által kifejlesztett molekuláris markerrel elemeztük, amely egy domináns marker és specifikus a narancssárga belső levelű fenotípusra. Ezt a markert olyan jellegzetes szekvenciák alapján tervezték, amelyeket az Lee és munkatársai detektáltak az narancs allél első exonjában és intronjában. Ennek eredményeként a PCR reakció során a narancssárga belső levelű fenotípusú egyed esetében egy kb. 480 bp méretű fragmentum amplifikálódik az 1%-os etídium-bromiddal festett agaróz gélen. (Lee et al. 2014)

### **3.7. COS (Conserved Ortholog Set)**

Amennyiben a genom-szekvencia ismeret rendelkezésre áll, úgy fejleszthető növénycsaládon belüli fajok közötti különbséget mutató (Conserved Ortholog Set) COS markerek. Ezek a markerek 1 kópiás konzervált génekre vannak tervezve, amik eltérő fajokban hosszpolimorfizmust mutatnak. A COS markerek kimutatása agaróz gélen zajlik (Jeong et al. 2014).

### **3.8. A vernalizáció és az embriómentés, vagyis az interspecifikus hibridizáció sikerességét elősegítő technikák**

#### 3.8.1. A vernalizáció

A vernalizáció egy olyan folyamat, mely alatt egy meghatározott ideig tartó alacsony hőmérsékletet értünk, ami a vegetatív fázis és a generatív fázis között van. A káposztafélék esetében elengedhetetlen, mivel a fejes káposzta és a karalábé – melyeket mi alkalmazunk - kétéves növények. Az első évben a vegetatív szerveiket fejlesztik ki, majd ezt követően a második évben magot hoznak. A fejes káposztának 0-3 °C-os, míg a karalábénak 0-2 °C-os hosszabb ideig tartó alacsonyabb hőmérsékletre van szükség. Ezzel ellentétben a kínai kel egyéves növény, ami azt jelenti, hogy a vernalizáció nélkül is már az első évben termést hoz.

#### 3.8.2. Az embriómentés

Az embriómentés célja a zigotikus embriók ontogenezisének fenntartása és befolyásolása, ami azt jelenti, hogy a fejlődéséhez és növekedéséhez szükséges és nélkülözhetetlen környezetet mesterségesen adjuk meg a zigóta számára. Célunk ezzel a folyamattal, hogy csíráképes embriót kapjunk, amelyből növényt fogunk nevelni szintén mesterséges körülmények között. Az embriókultúrák indítása során első fő lépés az embriók előkészítése, mely felületi sterilizést jelent és kipreparálást, ami esetünkben éretlen becőket fertőtlenítünk és felnyitjuk őket. Majd a magkezdeményeket steril táptalajra helyezzük és klimatizált körülmények között neveljük (Heszky 2014).

Az embriókultúrák segítenek távoli keresztezéseknél az abortálódás megelőzésében, haploid egyedek előállításában, a dormancia feloldásában és a nemesítési folyamat gyorsításában, illetve *in vitro* klónozásra is lehetőséget adnak (Chawla 2002).

Az embriómentés során két fő szakaszt különböztetünk meg: a heterotróf és az autotróf szakaszt. Az embriók heterotróf szakaszában proembriók vannak, melyeknek minden

tápanyagot biztosítani kell, mindegy, hogy ez szerves-, vagy szervetápanyag. Az autotróf szakaszban az embrió már képes a szerves sók és a szénforrások felhasználására. Az autotróf szakaszban 3 stádiumot különböztetünk meg. Az első az i, vagyis autonóm stádium, a második az ii, ami az élettani érettség stádium és az utolsó iii, ez pedig az ökológiai érettség stádium. Az autonóm stádiumban az embrió csírázásra képes fejlődésben van. Az élettani érettség stádiumban az embrió elérte az embrionális differenciáltságot, és ezek csírányugalomban vannak. Ezek mellett az ökológiai érettség stádium a már teljesen kifejlett, érett csíráképes embriókat jelenti. Az embriómentés sikere függ az embrió érési stádiumától, a táptalaj összetételétől és a genotípustól.

### **3.9. Növényi mikroszaporítás**

A biológiai oldal felől vizsgálva a növényi sejt- és szövettenyésztés technikái alatt azokat az *in vitro* steril sejt-, szövet- és szervtenyésztési technikákat értjük, amikkel a növényi izolátumok életben tarthatók, szaporíthatók és belőlük új növények regenerálhatók. Ivartalan szaporodás biotechnikái: azokat az *in vitro* (steril) sejt- és szövettenyésztési technikákat jelentik, melyekkel a növények aszexuális reprodukcióját (vegetatív szaporodását) befolyásolni vagy módosítani tudjuk.

A hajtástenyészet általában gyökér nélküli hajtások növekedését és fejlődését jelenti táptalajon, steril és kontrollált feltételek között. A mikroszaporítás a tenyészetekben fejlődő hajtásokra és oldalhajtásokra, illetve az azok levélhórnáljában differenciálódó rügyekre alapul. A hajtástenyészetek legfontosabb jellemzője, hogy a tenyésztés folyamán a hajtások normális növekedését tartjuk fenn, illetve serkentjük. A hajtástenyészet viszonylag egyszerű és megbízható technika, mely a többi módszerhez képest genetikailag a legstabilabb klónozást biztosítja, mert nincs de-, illetve redifferenciálódás, vagyis kallusz fázis. Napjainkban a hajtástenyésztés a mikroszaporítás és az *in vitro* génbank legáltalánosabban használt módszerévé vált, mind a kertészeti (dísnövények, gyógy növények és burgonya), mind az erdészeti fajok között (Heszky 2005).

A mikroszaporítás sikerességét befolyásoló tényezők: Az első a sterilitás. A növényi szövettenyésztésben használatos táptalajok jó feltételt jelentenek, de nem csak a növényeknek, hanem a mikroorganizmusoknak is. Egy növény akkor fertőződhet meg, ha a növényi explantum, a táptalaj vagy a nevelő edény nem volt jól sterilizálva. A második a felszíni

sterilizálás. A fertőződés Debergh és Zimmermann szerint történhet felszíni mikroorganizmusokkal, vagy ha a növényi szövetekben/kezelésbe jutnak a steril kultúrába, illetve ha valamilyen emberi hiba történik. Pierik 4 fő fertőzési forrást határoz meg: a növény külső, vagy belső fertőzöttsége, a nem megfelelően sterilizált táptalaj, a nem steril levegő és az ember által ejtett pontatlanság. A sterilizálás folyamata a következő: a növényi hajtásokat, leveleket tiszta késsel vagy metszőollóval leválasztjuk az anyanövényről, majd eltávolítjuk a szükségtelen részeket. A növényt sterilizálni kell először, mielőtt a táptalajra helyezzük. Ilyen eljárás az alkoholos (etanol) 70%-os töménységű folyadékban való 45 másodperces rázatás, majd ezt követi 1:3 NaClO-ban való rázatás 20 percen keresztül. Végül háromszor steril vízben mossuk át a növényi részeket, magokat, vagy becőket, és szűrőpapíron való szárítás után táptalajra helyezzük.

A munkánk során használt növényi táptalaj, vagyis az MS táptalaj, elsőként bemutatott alkotói a makro- és mikroelemek. A makro- és mikroelemek a táptalaj szerves komponensei. Kezdetben csak makroelemeket adtak a táptalajokhoz, mert ekkor még a növények számára elég mikroelemet is tartalmaztak szennyeződésként. Ilyen táptalaj a Knudson által leírt KC. 1987-ben George és munkatársai 685 féle makroelem- és 574 mikroelemösszetételt írtak le. Világviszonylatban a leggyakrabban használt táptalaj az MS táptalaj, amelyet Murashige és Skoog 1962-ben használt dohánykalluszt tenyésztéshez. Sokan nem tartják alkalmasnak ezt a táptalajt a sókoncentráció miatt, ezért különféle csökkentéseket alkalmaztak. A következő komponens a vitaminok. A vitaminok adagolása fontos az *in vitro* tenyésztésben lévő növények életben maradásához. A vitaminok hatását befolyásolja a táptalaj sókoncentrációja, pH-ja és a hőmérséklet. Fontos beszélni a növény szabályozó anyagokról, amik az auxin, gibberellin, citokinin és különféle gátló anyagok, amik alapvető élettani hatásokat fejtenek ki a növényekre. Az auxin adagolásával kallusztenyészeteket hozhatunk létre. Legfontosabb szerepük a sejtek megnyúlásos növekedésében és gyökérképződésben van. Az optimális koncentráció túllépésével gátló hatásukat fejezik ki. A citokininek a sejtosztódásban, differenciálódásban, az öregedés visszafordításában és a csúcsdominancia kialakításában játszik fontos szerepet. Az auxin és citokinin együttes alkalmazása megindítja a kalluszképződést. A citokininek indukálhatják a morfogenezist, mivel a termesztett növények egy része maguk is szintetizálnak hormonokat. A gibberellinek a megnyúlás növekedésében játszanak szerepet, főként fás növények tenyésztésénél használatosak (Jámborné Benczúr 2005).

### 3.9.1. *B. oleracea* in vitro mikroszaporítása

Nagy előrelépés történt a *B. oleracea* in vitro tenyésztés technikái terén. Az in vitro regenerációt számos tényező befolyásolja, többek között a genotípus, a táptalaj és a tenyésztési feltételek. A mikroszaporításhoz különböző típusú szöveteket használtak, többek között szár, levél, levélnyel, sziklelevél, szár, embrió, gyökér, hajtáscsúcs, hónaljrügy, stb. A *B. oleracea* leggyakrabban használt táptalaja az MS, LS és B voltak. Ezeket a táptalajokat különböző típusú és mennyiségű hormonokkal módosították. A tenyésztési feltételek hasonlóan változatosak voltak. A fény, a hőmérséklet, az időtartam különböző hatással volt a regenerációra, és számos ilyen vizsgálatban a genotípus és a tenyésztési feltételek kölcsönhatásának jelentős hatásairól számoltak be (Jourdan és Earle 1981, Lillo és Olsen 1989). Ezért nincs egyetlen, az összes *B. oleracea* alkalmazható mikroszaporítási ajánlás sem.

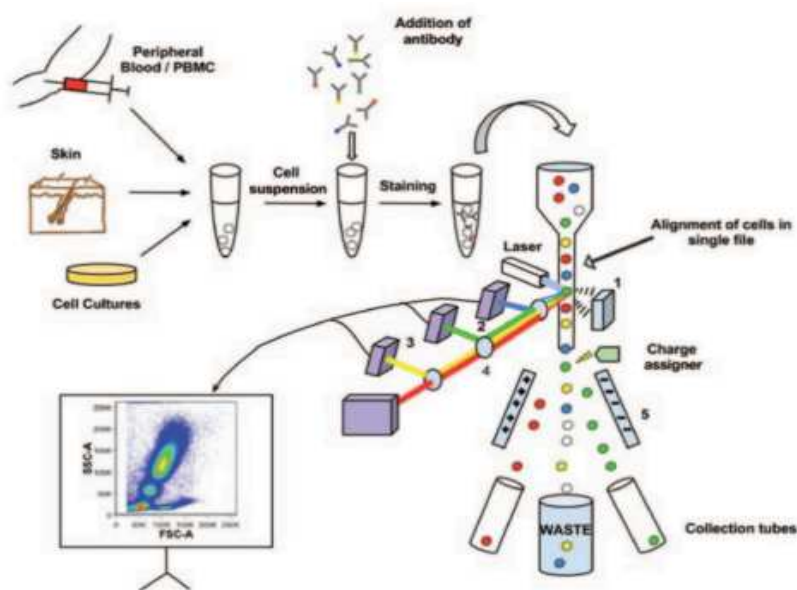
*Brassica oleraceae* L. var *Capitata* hibrid vetőmagokat sterilizést követően MS táptalajra helyezte, amik 24 nap elteltével in vitro környezetben növényekké fejlődtek. Az általuk alkalmazott, magból nevelt in vitro növény módszerét - a steril körülmények közt élő növény nyeresre - Smith (2000) véleménye alapján választották, aki kiemeli a szövet korát, miszerint a fiziológiailag fiatalabbak általában jobb hatékonysággal és könnyebben reagálnak in vitro, míg az idősebb szöveteket vontatott, nehézkes fejlődés jellemzi, vagy egyáltalán nem reagálnak.

### **3. 10. Flow citometria**

A flow citometria, más néven áramlási citometria, egy rendkívül érzékeny és hatékony módszer, amely lehetővé teszi többféle információ megszerzését a sejtekről, például a sejtekben lejátszódó folyamatok, fehérjék detektálása, sejtciklus, valamint relatív genomméret meghatározás tekintetében. Ez a technika lehetővé teszi az egyes sejtek jellemzőinek külön-külön történő meghatározását, így alkalmazható akár heterogén sejtpopulációkban is az egyes sejtek megkülönböztetésére és szelektálására azok tulajdonságai szerint.

Különálló sejteket vizsgál egy detektor rendszeren áthaladó folyékony közegben. Először specifikus fluoreszcens jelöléssel ellátott antitesteket vagy fluoreszcens festékeket kell választanunk a detektálni kívánt sejtek számára, melyek plazma membránt, DNS-t vagy enzimek szubsztrátjait festik meg. A mintát elő kell készíteni enzimes bontással,

centrifugálással és/vagy filtrációval, hogy elkülönítsük a vizsgálni kívánt sejteket. Ezután a sejtszuszpenzióhoz hozzáadjuk a fluoreszcens festéket/festékeket, majd a flow citométer sejtmentes puffer oldatába helyezzük, amely segítségével a sejtek egymás után haladnak el egy lézervény előtt, így megtörténik a detektálás. A sejteket tartalmazó folyadék egy vékony kapillárisban halad át, ahol a lézervény detektálja. A megfestett sejtek által kibocsátott fluoreszcens fényt az optikai rendszer észleli, és egy számítógépbe továbbítja, ahol a kapott adatok alapján grafikai ábrát készít (Jahan-Tigh et al. 2012). A flow citometria módszerét relatív genomméret meghatározására használtuk a munkánk során.



6. ábra. A flow citométer működésének sematikus rajza

Az F2-es növények relatív genomméretét és kromoszómaszámát 2020-ban Czinege Dóra határozta meg annak érdekében, hogy megértsék, hogyan áll helyre a fertilitás a hímsteril F1 növény oldalhajtásában. Ehhez ismert kromoszómaszámú referencia növényeket használtak, mint például a fehér karfiolt ('Amerigo', CC,  $2n=2x=18$ ) és a narancs kínai kel ('Orankin', AA,  $2n=2x=20$ ). A kutatás eredményeként kiderült, hogy a helyreállt fertilitásért kromoszóma készlet duplikáció a felelős, amelynek eredményeképpen az F2 növények  $2n=4x=38$  kromoszómakészlettel rendelkeztek a vizsgálat során. Ennek oka valószínűleg a spontán endomitózis volt az oldalhajtás merisztémájában (Czinege, 2020).

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált növényanyagok a keresztezésben

A BC<sub>4</sub> hibrideket eredményező keresztezésekben a 12 BC<sub>3</sub> genotípust (7. ábra) alkalmaztuk anyanövényként, melyeket „színkódokkal” láttunk el (O51/I-IBOLYA, O51/II-MÁLYVA, O51/III-LILA, O51/IV-KÉK, O52/I-CIKLÁMEN, O52/II-PINK, O52/III-NARANCS, O52/IV-PIROS, O52/V-RÓZSASZÍN, O52/VI-FEHÉR, O52/VII-SMARAGD, O52/VIII-MAGENTA).



7.ábra A BC<sub>3</sub> egyedek virágzása a keresztezés idején Ócsán

A pollen partnerek káposzták, vagy a keresztezésben eddig használt Bridge növények (2 darab) voltak. A bevont Bridge genotípusok eredete ismeretlen, genomösszetételüket vizsgálva a *B. rapa* és *B. oleracea* között átmenetet képeznek. Összesen 37 keresztezéses kombinációnk volt, amit az 1. számú melléklet mutat be. Ezekből minimum 20 db becőt kívántunk az anyanövényről begyűjteni, amihez általában 60 db virágport kellett porozni.

Mivel a káposztafélék két éves fejlődésűek, így a vegetatív részek kialakításához szükségük van vernalizációt alkalmazni a nemesítés során. Ez az eljárás hat hetes hűtőkamrában való elhelyezést jelent, ahol a hőmérséklet 4 °C, emellett 75%-os páratartalmat és 12 órás pótmegvilágítást ad a növényekre számára. A virágzat fejlődéséhez szükséges kálium tápoldat mennyiségét is biztosítottuk.

A keresztezéseket bimbókon végeztük el, aminek folyamatát a 8. ábra mutatja be. A virágzati száron az összes olyan bimbót kinyitottuk, amelyek 2-3 napon belül virágzásra készen

állnak. Fertőtlenített csipesz segítségével ablakot nyitottunk rá, hogy a 6 db porzószálat a 6 db portokokkal közösen el tudjuk távolítani az öntermékenyülés elkerülése végett. A pollent adó hímvirág szülő virágait begyűjtjük és a virágzati tengelyen az ablakos bimbókat termékenyítési sorrendben, vagyis lentől-felfelé haladva termékenyítjük. Majd ezt követően zacskót helyezünk rájuk, hogy elkerüljük a rovarok, vagy a szél hatását, azaz, hogy más idegen pollen kerül a kész keresztezett bibére. Ezt követően kilélegzett levegőt fújunk a lezárt zacskóba szívószál segítségével, - aminek a CO<sub>2</sub> koncentrációja 5% - amire a pollentömlő hajtásához szükség van, illetve növeli a páratartalmat, így elkerüljük a kiszáradást. Minimum 4 órát követően a zacskót eltávolítjuk. A sikeres és termékenyített becőkön kis „dudorok” látszanak, melyek az magkezdemények elhelyezkedését mutatják. A begyűjtésük időpontja változó, minden héten hétfőn ellenőrzik a becőket, amelyiken ezt a jelenséget látják, azt eltávolítják, és felcímkézett tasakban a laborba juttatják, ahol megkezdődik az embriómentés folyamata.



8. ábra: A keresztezés bemutatása és folyamata (1.: bimbó feltárása, és a porzok eltávolítása, 2.: termékenyítés, 3.: zacskó felhelyezése)

#### **4.2. Embriómentés**

A laborba érkezett becők változó érettséget mutattak, ami azt jelenti, hogy volt becő, amelyik 14 naposan, de voltak olyanok, amik 28 naposan érkeztek be a laborba lezárt, felcímkézett zacskókban. Ócsa és Gödöllő közötti távolság közel 50 km, ami közel 50 perc utazást jelent, így a folyamatot az abortálódás elkerülése érdekében azonnal megkezdjük. Előkészülethez tartozik a lamináris fülke áttörlése detergenssel, majd UV lámpával csíramentesítettük azt 20 percen keresztül. Ezalatt a folyamat alatt a csipeszeket és szikéket alufóliába csomagolva kuktában kifőztük. Majd a lamináris fülkébe steril lombikokban hajtottam végre a következő protokollt: I.: 70%-os etanolban rázni a becőket, majd csipesszel

a következő lombikba rakni. II.: 3:1 arányú hypo oldatban rázni, és csipesszel a következő lombikba helyezni. III.: Steril desztillált vízben rázni, és újra az etanolba helyezni. Ezt a három lépést (I.-III.) 11-szer kellett megismételni. Ezt követően steril szűrőpapírt helyezünk egy Petri-csészébe, ráhelyeztük a becőket száradni, és az eszközöket az eszköztartóba kihelyezzük (9. ábra).



9. ábra: Az embriómentés folyamán használt eszközök

Steril csipesszel és szikével felnyitottuk a becőket, és szilárd embryo-rescue (ER) táptalaj felületére helyeztük őket keresztezésenként. Az ER táptalaj előállításához használt komponenseket a 2. számú melléklet tartalmazza (az embrióregeneráló táptalajban a  $\text{CaCl}_2$  esetében külön törzsoldatot kellett előállítanunk, mivel ez az oldat kicsapódásra hajlamos). A Petri-csészéket a magkezdeményekkel fényszobába helyeztük  $21^\circ\text{C}$ -os hőmérsékletre 16 óra világos- és 8 óra sötét megvilágításra, amiket négy naponta ellenőriztünk, hogy fertőződtek-e.

A csírázásnak indult hibrideket 2/3 cukortartalmú MS táptalajra helyeztük át, aminek az összetételét a 3. számú melléklet mutatja be. Az MS táptalaj törzsoldatainak koncentrációját a 4. számú melléklet szemlélteti. Elkészítése a következő: egy lombikban kevés desztillált vízbe a táptalaj törzsoldataiból (Makro, Mezo, Mikro, Vitaminok, KI,  $\text{CaCl}_2$ ) a megfelelő mennyiségeket (2. táblázat) kimértük, majd hozzáadtuk az inozitolt és a szacharózt, amit mágneses keverőn addig kevertük, míg a szacharóz kristályok fel nem oldódtak. Ezt követően mérőhengerben további desztillált víz hozzáadásával kimértük a megfelelő térfogatot és mágneses keverés mellett beállítottuk a megfelelő (5,8) pH-t. Az agar hozzáadását követően lefedtük alufóliával az Erlenmeyer lombikot, kuktába tettük és a túlnyomástól számított 20 perc csíramentesítést követően steril Petri-csészékbe, fiolákba vagy kis üvegcsékbe öntöttük. Szilárdulást követően a fiolákat és az üvegcséket két réteg fóliával zártuk le. A Petri-csészéket

parafilmmel húztuk körbe. A táptalajokat használatig 21 °C-fokon tároltuk. Minden üvegedényt címkével (névvel és dátummal) láttunk el.

#### **4.3. A DNS alapú vizsgálatok**

Korábban a laborban lefolytatott tesztek alapján a DNS izolálásához legalkalmasabbnak mutakozó módszer a NucleoSpin (Macherey Nagel) kit változatát használtuk. A protokollt az 5. számú melléklet mutatja. Így fiatal leveleket gyűjtöttünk be, ami a DNS izolálás növényanyagát jelentette.

A BC3 hibrid növények és kontroll egyedek (orankin, karalábé, F1) DNS-t használtuk a PCR reakciókban. A nanrans mutáns gén jelenlétét a BRa-OR primerpárral vizsgáltuk (BRa-OR-F (Bra031539-OC\_MF1): 5'- GAGGTCTGTTTCTACGAGTACGG -3', BRa-OR-R (Bra031539-OC\_MR1): 5'- CTCATTAGTCCATCTCCGACCA -3') (Lee et al. 2014). A PCR reakció előállításánál során a következő protokollt használtuk, amiben 10 µl végtérfogatú mintára (2 µl a DNS és 8 µl a mastermix) a következő volt a mastermix keverék: desztillált víz: 3,65 µl, 5x puffer: 2 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>: 0,5 µl, 2 mM dNTP: 0,3 µl, 10 µM reverse primer: 0,75 µl, 10 µM forward primer: 0,75 µl, 5 µg/µl Taq polimeráz: 0,05 µl. A PCR gépben beállított protokoll a következő volt: Az előciklus: 94 °C, 2 perc („hot start”), ezután 10 cikluson keresztül zajlottak a következő lépések, ahol az annealing során hőmérséklete ciklusonként 0,5 °C-kal csökkent: denaturálás: 94 °C, 30 másodperc, annealing: 72 °C, 30 másodperc, szintézis: 72 °C, 1 perc. Majd 24 cikluson keresztül a következő lépések: denaturálás: 94 °C, 30 másodperc, annealing: 61 °C, 30 másodperc, szintézis: 72 °C, 1 perc, végül utópolimerizáció: 72 °C, 5 perc.

A PCR termékek detektálásához 1%-os agaróz gélt készítettünk, ami elkészítésének a lépései a következők voltak:

1. Az összetevők kimérése (kisebb gél esetén): 80 ml 0,5 x TBE puffer, 0,8 g agaróz.
2. Az üvegbe kimért pufferhez hozzáadni az agaróz port, majd mikrohullámú sütőben addig melegíteni, folyamatos ellenőrzés mellett, amíg az teljesen fel nem oldódik az agaróz por.
3. Csap alatt, lassú folyó víz mellett visszahűteni, miközben folyamatosan rázni kell az üveget.

4. 2,5 µl etídium-bromid hozzáadása, majd elegyedésig keverni.
5. Az előkészített (két oldalt ragasztó szalaggal lezárt) tálcába önteni a szintelen gél. A buborékokat pipetta hegygel kilyukasztani, végül belehelyezni a fésűt, és várni, amíg megszilárdul.
6. Ha szilárd a gél, akkor a tálcáról eltávolítani a ragasztószalagot és a fésűt, majd a kádba helyezni. A PCR termékeket a zsebekbe pipetázni, és elindítani a futtatást.

A futtatási folyamat 90 V-on 30 percig tart 0,5 x TBE pufferben. A PCR termékek esetében molekulatömeg markerként GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder-t (Thermo Fisher) alkalmaztunk, amely 10 féle DNS fragmentből áll 100 bázispáronként. A futtatást követően a gélről Alpha Innotech Multimage™ Light Cabinet-tel készítettünk képet, amely UV fényes megvilágítás segítségével detektálja a fragmentek helyzetét.

A COS markerek esetén négy primerpárt használtunk (COS015-F 5'-ATCAATGCGGTTGTGATGAT -3', COS015-R 5'-GTTCGCTGTCTTGACCTTTTGTGAT -3', COS264-F 5'-GCGAAAGTCTCCGTCGAG -3', COS264-R 5'-TCCGTCTCTTCTTTGAGTCTCTTT -3', COS420-F 5'-GCGCGAACTACTCGCTAAAC -3', COS420-R 5'-GATCTCATCTTCTGTGAAGTCCAA -3', COS424-F 5'-CACATGCAGAAAATTCTTTCAAAC -3', COS424-R 5'-TGAATCATCGTATTTGAGAGTTGTG -3') (Jeong et al. 2014) a Bra-OR primerpár PCR mastermix összetételével megegyező módon, míg a PCR protokollok a Bra-OR primerpárhoz képest annyival különbözött, hogy a touchdown protokollban 65 °C-ról indítottuk a PCR programot és 10 ciklus alatt 1 °C-kal csökkent a hőmérséklet ciklusonként. A PCR termékek elválasztásához a fentebb említett 1%-os agaróz gél készítettünk. A gélelektroforézis paraméterei megegyeztek a Bra-OR primerével.

#### **4.4. Flow citometria**

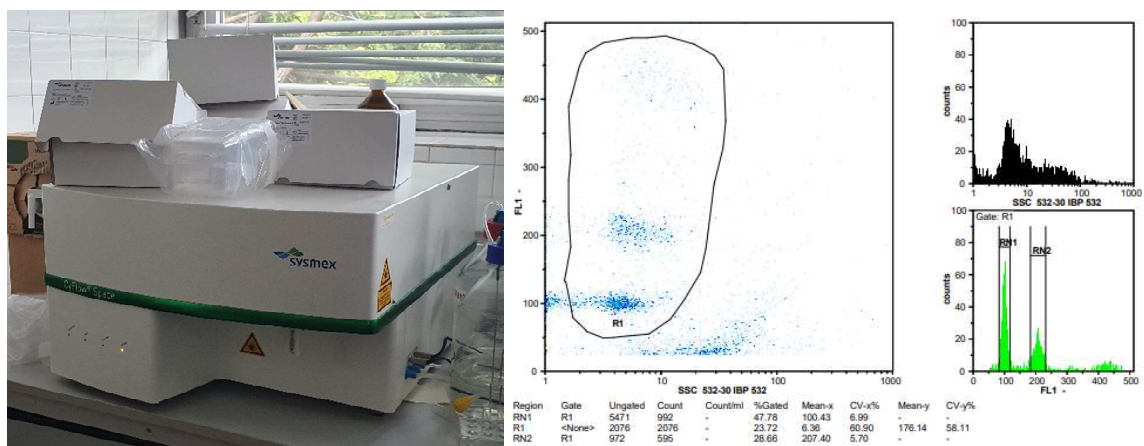
A flow citometriai mérések növényanyagát steril kultúrában lévő növényeink adták, amik az eredeti 12 BC<sub>3</sub> növényünk és a négy standard (orankin, karalábé, F1 steril, F1 fertil) *in vitro*-ban fenntartott klónjai voltak. Az orankin, karalábé, F1 fertil esetén - melyek az eredeti szülői partnerek és a hibrid – magok érkeztek a laborba a Syngenta Kft. Ócsai telephelyéről. A magok fertőtlenítéséhez lamináris fülkében dolgoztunk a következő protokollt alkalmazva: I.:

70%-os etanollal felöntött lombokban 45 másodpercig rázatjuk a magokat, II.: steril csipesz segítségével átrakni egy másik lombikba a magokat, III.: 3:1 arányú hypo oldattal felönteni a lombikot és rázatás 20 percen keresztül rázógépen, IV.: steril csipesz segítségével steril vizes lombikba helyezni a magokat és háromszor átmosni a magokat, V.: steril Petri-csészébe steril szűrőlapot helyezni és a nedves magokat ráhelyezni száradni, VI.: steril csipesz segítségével előre elkészített 2/3 cukor arányú MS táptalajt tartalmazó üvegbe helyezni 4-5 magot, VII.: a steril szárrészeket MS táptalajra helyeztük, majd 21 C° fokos fényszobába tartottuk 16 órás világos, majd 8 órás sötét 4000 LUX megvilágítással. Az MS táptalajon nem fertőződött, oldalhajtatást hozó szárrészeket steril csipesz és szike segítségével levágtuk és MS táptalajt tartalmazó kis befőttesüvegbe helyeztük, hogy a nagyobb hely miatt jobban érezze magát a növény.

Ezt a protokollt alkalmaztuk akkor is, ha növényi szárrész felületi fertőtlenítésével akartunk *in vitro* kultúrába bevinni növényeket (O51 mályva, O51 ibolya, O52 piros, O52 ciklámen, F1 steril).

A Flow citometriai mérések során steril *in vitro* kultúrában lévő növényeink leveleit használtuk. Az eljárási protokoll a következő:

1. Sejtmagok izolálása: 0,5 cm<sup>2</sup> nagyságú levélfelületet éles pengével minél jobban bevagdostani 700 µl extrakciós puffer használata mellett.
2. Szuszpenzió szűrése: A sejtmagokat tartalmazó 500 µl szuszpenziót egy 50 µm pórusátmérőjű szűrőpapír segítségével 3,5 ml térfogatú csövekbe.
3. Sejtmagok festése: Festő puffert hozzáadni, ami 2 ml (Staining puffer: 120 µl propidium-jodid + 60 µl RNase).
4. Mérés és meghatározás: CyFlow®<sup>j</sup> Space (Sysmex) (10. ábra) eszközzel, zöld lézer segítségével meghatározni a relatív genomméretet 532 nm-en FloMax (Sysmex) szoftver alkalmazásával.

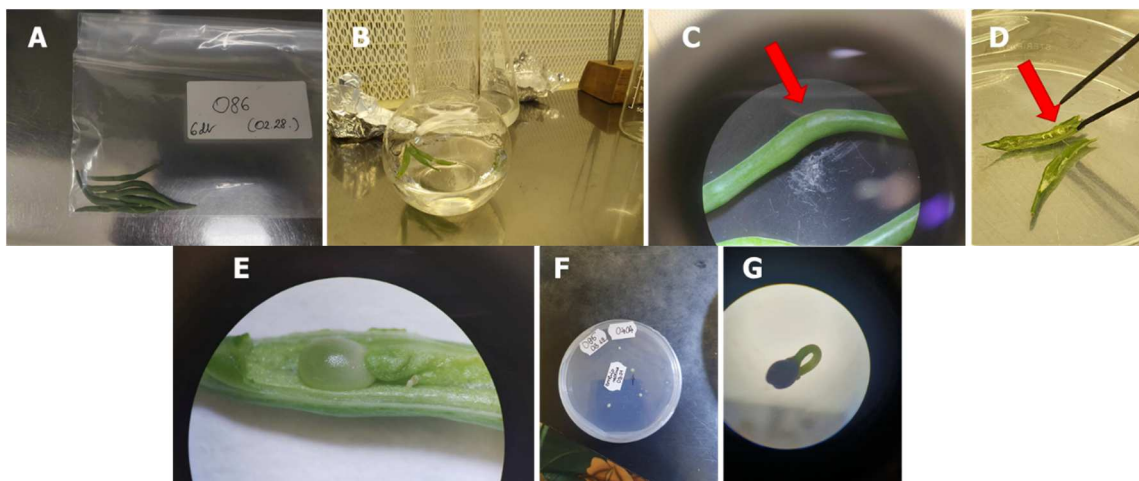


10. ábra: CyFlow®j Space (Sysmex) citométer gép és a FloMax (Sysmex) szoftver által készített eredmény

## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1. Az embriómentés eredményei a BC<sub>4</sub> generációnál

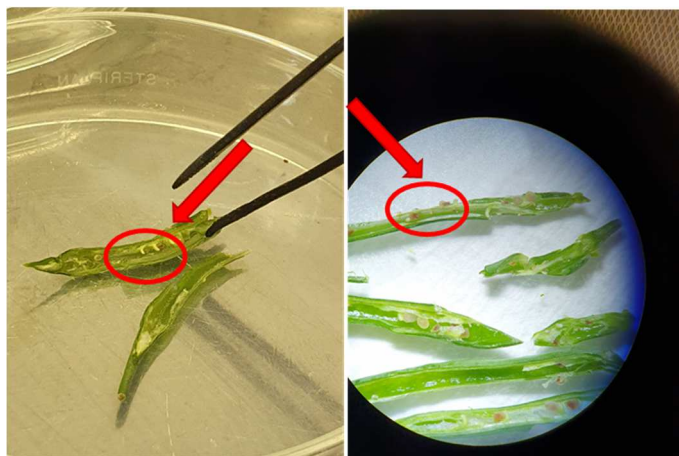
Tíz héten keresztül folytak a keresztezések Ócsán a BC<sub>4</sub> hibrid egyedek előállításához (1. számú melléklet). Az éretlen becők hetente – abban az esetben, ha volt becő – érkeztek a laboratóriumba. Összesen 78 éretlen becő érkezett (12 keresztezésből: O69, O70, O71, O80 O83, O86, O87, O88, O91, O94, O95, O96 és O98), melyek felületi sterilizálása után (11. ábra A-B) 253 magkezdeményt sikerült izolálni (11. ábra D-E) – O70, O71 és O80 kombinációk esetén nem volt vitális magkezdemény - és sikeresen embryo-rescue táptalajra helyezni (11. ábra F). A becőkön szabad szemmel jól látható volt, hogy melyikben van magkezdemény, mivel ott kidudorodott a becő. Minden esetben sikeres volt az eljárásunk, mert fertőzést két hét elteltével sem tapasztaltunk a táptalajon, illetve az magkezdeményeken. A számunkra megfelelő magkezdemény fejlett, halványzöld színű, közepes, illetve nagyméretű és kerek a formája. Eddig hét különböző kombinációból, összesen húsz magkezdemenynél sikerült elérni a csíranövény állapotot (11. ábra G). Azonban ez a kutatás még folyamatban van és ennél sokkal több hibridre számítunk az elmúlt évek tapasztalatai alapján. Az eddigi összesített eredményeinket a 6. számú melléklet tartalmazza.



11. ábra: Embriómentés folyamata (A: beérkezett becők, B: felületi sterilizálás folyamat, C: látható magkezdemény a becőben, D-E: magkezdemények begyűjtése, F: az embriók embryo-rescue táptalajra helyezése, G: a megpattant magkezdemény)

A különböző kombinációk eltérő eredményt mutatta. Az O70-es, O71- es és O80-as keresztezésekből érkezett becők abortált magkezdeményeket mutattak (12. ábra), míg az O69-

nél csak egy magkezdeményt tudtunk ER táptalajra helyezni. A kezdetben halványszínű embrióo elkezdett a többi egyedhez hasonlóan sötétedni, de a csírázási folyamat még nem kezdődött el nála.



12. ábra: O70 és O69 elhalt magkezdemények a becőben

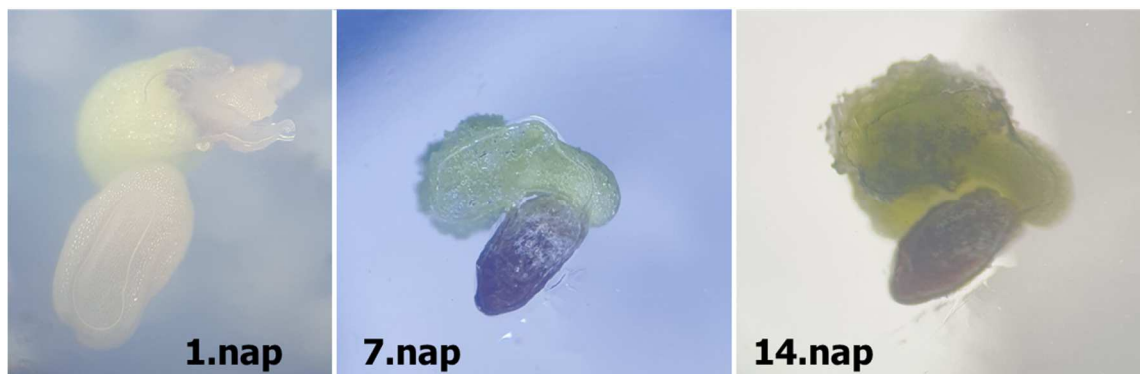
Az O83 és O98 keresztezésekből 1-1 hibrid a táptalajra helyezéstől a megpattanásig eltelt fejlődési útját mutatja a 13. ábra. Ez a két kombináció esetében volt eddig a legrövidebb idő ez a folyamat, ami 14 napot jelentett.



13. ábra: O83 (A) és O98 (B) keresztezésből származó 1-1 hibrid genotípus nyomon követése

Nem minden esetben indult meg a csírázása a magkezdeményeknek, hanem egy idő elteltével a táptalajra helyezés után elkezdtek besötétedni és a becőből származó anyai szövet

kalluszosodni kezdett. Ennek oka az lehet, hogy a becő feltárásakor anyai szövetet is izoláltunk a magkezdeménnyel együtt (14. ábra).



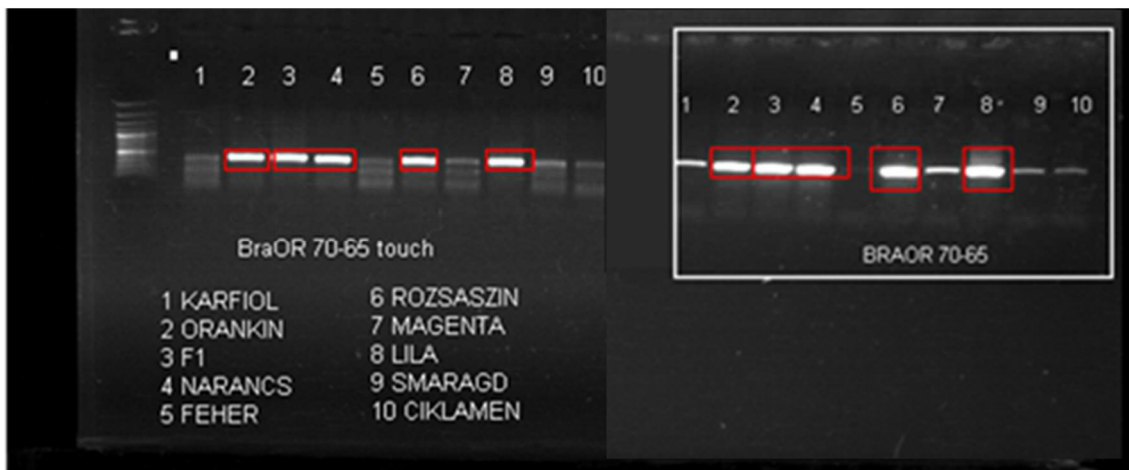
14. ábra: Kalluszosodott izolátum

Hús hibrind indult csírázásnak és elkezdte fejlődését, ezek az O83, O86, O87, O88, O94 és O96, O98 keresztezésből származnak. A csíranövényeket egyesével 2/3-os cukortartalmú MS táptalajra helyeztük és detektáljuk minden héten fejlődésüket (13. ábra: üvegcsében lévő növény).

## 5.2. PCR eredmények molekuláris vizsgálatoknál

### 5.2.1. Bra-OR primerpár

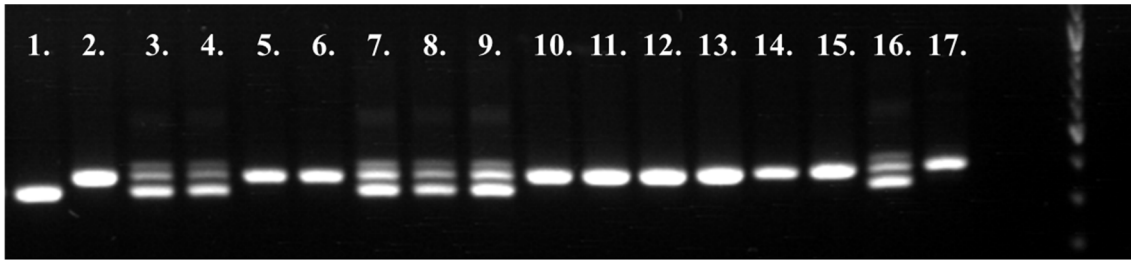
A Bra-OR primerpár használata során annál az esetről, ahol jelen van a narancs kínai kel CRTISO1 génje, egy közel 480 bp nagyságú fragmentumot kell kapnunk. Az eredmény az elvárásainknak megfelelő, mivel a narancsszínű gént hordozó orankin szülő esetében jól láthatóan megjelent a fragmentum közel 480 bp-nál. Szintén ezt a jelenséget tapasztaltuk az F1 esetében is. Továbbá elmondhatjuk, hogy a vizsgált hét BC<sub>3</sub> hibrind növényből három hordozza a kívánt narancssárga színű gént, ezek az O52 narancs (4-es minta), az O52 rózsaszín (6-os minta) és az O51 lila (8-as minta) hibridek. (15. ábra). A többi esetben nem amplifikálódott erősen a kívánt fragmentum, ami esetén úgy regisztráltuk a vizsgált mintákat, hogy azok nem hordozzák a narancs mutáns gént. A nem kívánt fragmentumok megjelenése PCR protokoll optimalizálása kiküszöbölhetővé válik, ez további kísérleteink egyik célkitűzése. Korábbi kutatásaink során teszteltünk hat BC<sub>3</sub>-as egyedet, amiből tudjuk, hogy az O51 kék, O52 piros és az O52 pink is hordozzák a narancs gént (Poór K. 2023).



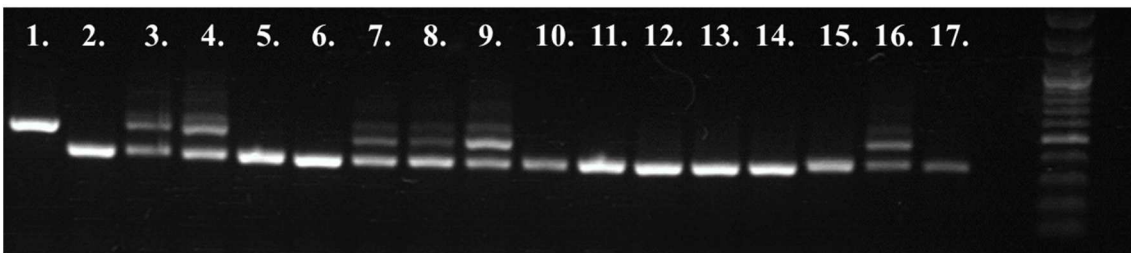
15. ábra: A BC<sub>3</sub> hibridek PCR termékeinek elválasztása 1%-os EtBr festett agaróz gélen, Bra-OR primerpárt alkalmazva

### 5.2.2. COS markerek primerpárjaival elért eredmények

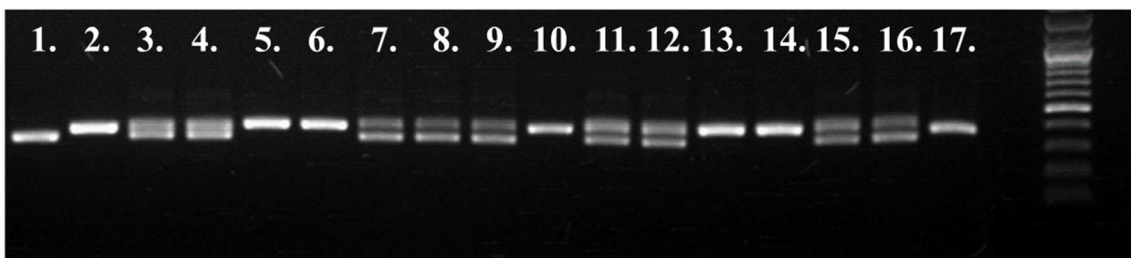
Az általunk használt COS marker primerpárokból négyet választottunk a vizsgálathoz, ezek a COS015, COS420, COS424 és a COS264 primerpárok. A vizsgálatunk eredményeit a 16., 17., 18. és 19. ábrák mutatják be. A COS015, COS420 és COS424 primerpárok használatánál az elvárt eredményt kaptuk, miszerint a kontrollként használt *B. rapa* (orankin) A genomra jellemző méretű DNS szakaszt szaporít fel a PCR reakcióban, míg a C genommal rendelkező *B. oleracea* egyed (2-es minta karalábé) egy ettől eltérő méretű szakaszt hordoz (16., 17., és 18. ábra). Emellett azt is látjuk, hogy az F1 hibrid (3. és 4. minta) mindkét genomra specifikus fragmentumot tartalmazza (16., 17., 18. ábra), csakúgy, mint az O51-es keresztezési kombinációból származó három hibrid (7-es minta O51 ibolya, 8-as minta- O51 mályva, 9-es minta- O51 lila, 16-os minta- O51 lila). Az O52-es keresztezésből származó növények két csoportba sorolhatók a három kiértékelhető COS marker eredménye alapján. Az első csoportba tartozó öt minta mind a három markerrel C genomra jellemző fragmentumot mutattak (5-ös minta- O52 ciklámén, 6-os minta- O52 pink, 10-es minta- O52 narancs, 13-as minta- O52 fehér, 14-es minta- O52 smaragd). A másik csoportba tartozó három O52-es minta a COS264 markerrel (18. ábra) mindkét genomra jellemző fragmentumot mutatja (11-es minta- O52 piros, 12-es minta- O52 rózsaszín, 15-ös minta- O52 magenta) míg COS015 és COS420 markerekkel C genomra jellemző szakaszt hordoznak. (16., 17. ábra)



16. ábra: A COS015 primerpárral történő DNS alapú vizsgálata a BC<sub>3</sub> hibrid egyedeknél (1: orankin, 2: karalábé, 3: F1, 4: F1, 5: ciklámen, 6: pink, 7: ibolya, 8: mályva, 9: lila, 10: narancs, 11: piros, 12: rózsaszín, 13: fehér, 14: smaragd, 15: magenta, 16: lila, 17: káposzta)



17. ábra: A COS420 primerpárral történő DNS alapú vizsgálata a BC<sub>3</sub> hibrid egyedeknél (1: orankin, 2: karalábé, 3: F1, 4: F1, 5: ciklámen, 6: pink, 7: ibolya, 8: mályva, 9: lila, 10: narancs, 11: piros, 12: rózsaszín, 13: fehér, 14: smaragd, 15: magenta, 16: lila, 17: káposzta)



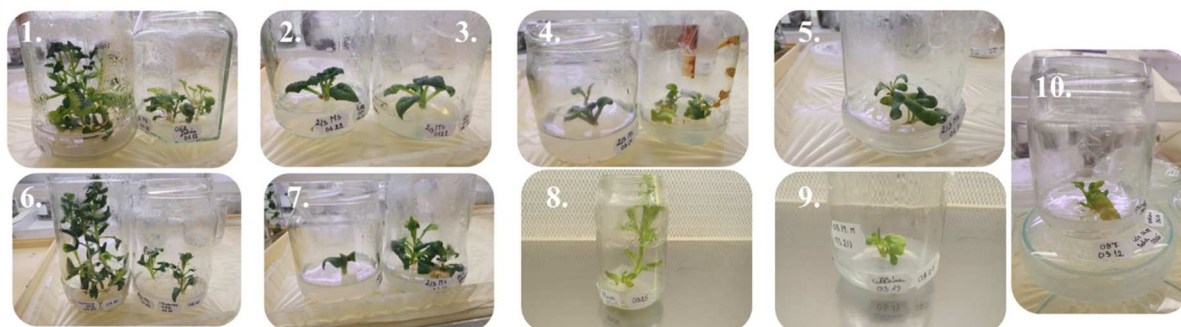
18. ábra: A COS264 primerpárral történő DNS alapú vizsgálata a BC<sub>3</sub> hibrid egyedeknél (1: orankin, 2: karalábé, 3: F1, 4: F1, 5: ciklámen, 6: pink, 7: ibolya, 8: mályva, 9: lila, 10: narancs, 11: piros, 12: rózsaszín, 13: fehér, 14: smaragd, 15: magenta, 16: lila, 17: káposzta)



19. ábra: A COS264 primerpárral történő DNS alapú vizsgálata a BC<sub>3</sub> hibrid egyedeknél (1: orankin, 2: karalábé, 3: F1, 4: F1, 5: ciklámen, 6: pink, 7: ibolya, 8: mályva, 9: lila, 10: narancs, 11: piros, 12: rózsaszín, 13: fehér, 14: smaragd, 15: magenta, 16: lila, 17: káposzta)

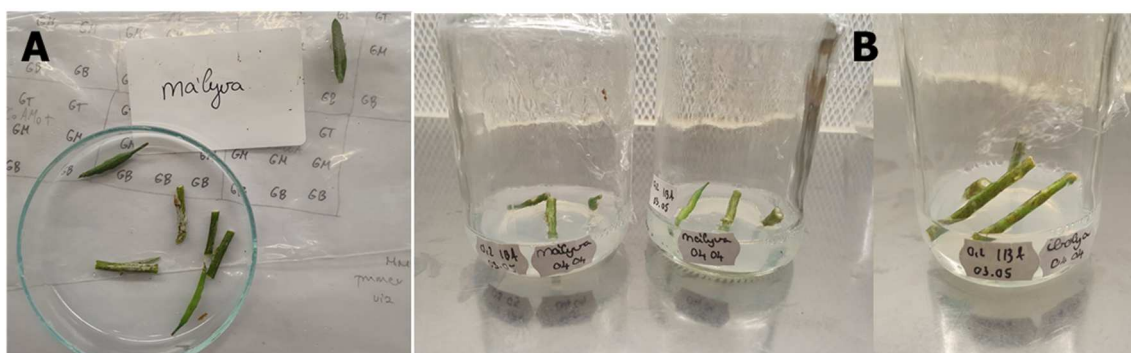
### 5.3. *In vitro* kultúrában tartott BC<sub>3</sub> hibrid növények eredményei

A BC<sub>3</sub> hibrid növények (O51-es és O52-es hibridek összesen 12 genotípus) *in vitro* kultúrában lettek felnevelve, azonban, hogy a következő keresztezési ciklusban anyanövényként szerepeljenek, korai akklimatizálásra és kiültetésre volt szükség, így az időben később csírázó magkezdeményekről klón egyedet *in vitro* kultúrában nem tartottunk meg a laboratóriumban. 10 növénynél sikerült klónokat létrehozni steril kultúrában, amit a 20. ábra mutat be.



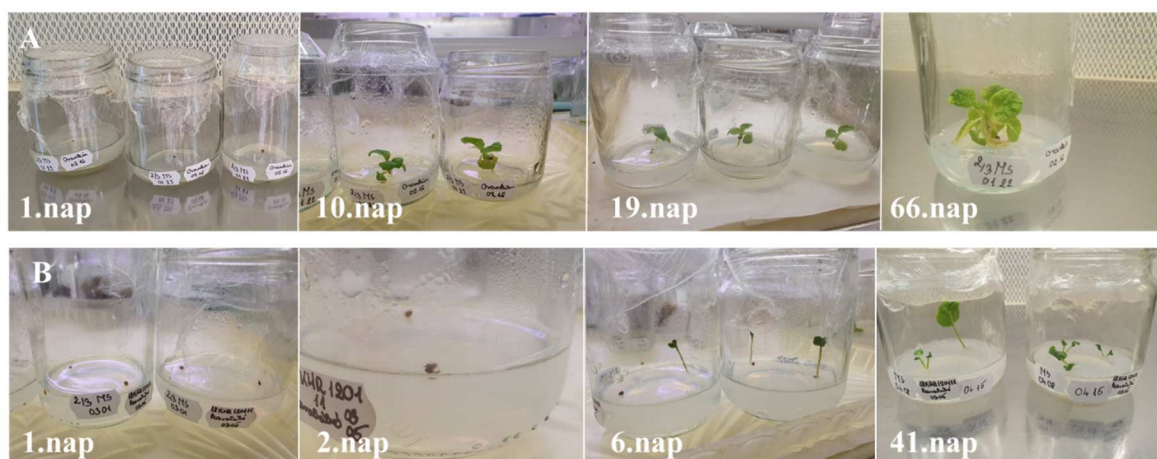
20. ábra: In vitro kultúrában élő BC<sub>3</sub> klón genotípusok (1: fehér, 2: kék, 3: lila, 4: smaragd, 5: magenta, 6: narancs, 7: rózsaszín, 8: piros, 9: ciklámen, 10: pink)

Öt genotípus esetében – O51 ibolya, O51 mályva (21. ábra), O52 piros, O52 ciklámen, F1 steril hibridek – szárrészeket helyeztünk felületi sterilizálás után 2/3-os cukortartalmú MS táptalajra. A beérkezett szárrészek liszteskével nagyon fertőzöttek és vékonyak voltak. A fertőtlenítés sikeres volt, de a hónaljhajtásokból való hajtás fejlődése három hét után sem kezdődött meg, így tovább várunk.



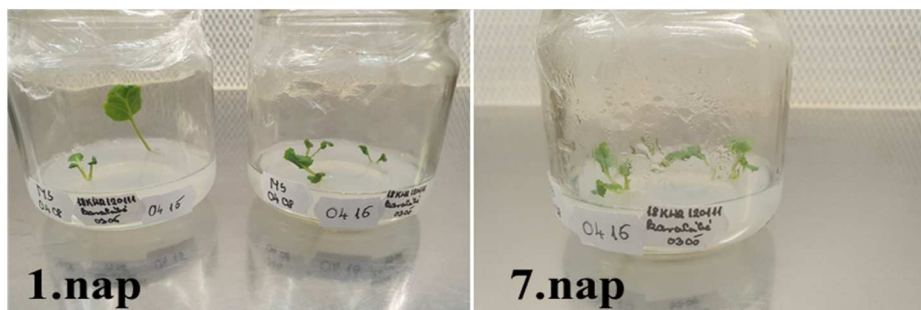
21. ábra: Ibolya és mályva hibridek *in vitro* kultúrába vitele (A: megérkezett szárrészek, B: felületi sterilizálás után táptalajra helyezés)

A flow citométer elemzéséhez használt standard növény minták az F1 hibrid eredeti két szülőjét és az F1 fertil egyedeket jelentette. Ezek esetén magról indítottuk az *in vitro* kultúrába vitelt. Mind kísérletben 8-8 magot felületi sterilizés - 4.2.2. fejezetben említett protokoll alapján - után 2/3 cukortartalmú MS táptalajra helyeztük. A fertőtlenítés sikeres volt, hiszen egyik egyednél sem jelent meg baktérium, vagy gombatelep. Megpattanásukat, és a csíranövény fejlődését nyomon követve fényképeket készítettünk a növényekről (22. ábra). Az orakin magok 2024. február 16-án lettek táptalajra helyezve, a karalábé magok pedig 2024. március 5-én lett a fejlődésük *in vitro* kultúrában elindítva.



22. ábra: Az orakin - (A) és a karalábé (B) magok és csíranövények fejlődése

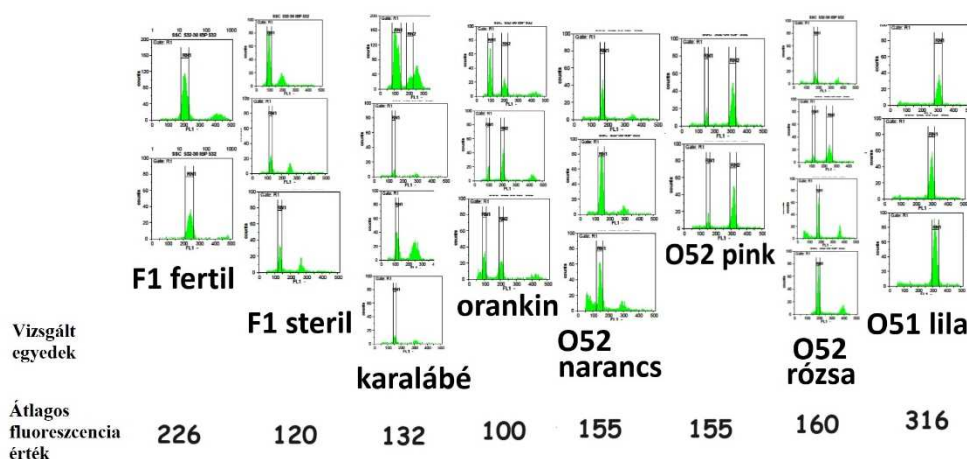
Két hét eltelte után az orakin egyedek számára a 2/3 cukortartalmú MS táptalaj megfelelő volt, de a karalábé növényeknél vontatott fejlődést tapasztaltunk, mivel az egyedek megnyúltak és nem haragos zöld színűek voltak. Így MS táptalajra helyeztük őket, ahol várjuk a növények jobb fejlődését (23. ábra). Egy hét elteltével látható, hogy a levelek színe elkezdett sötétedni, és nem nyúltak tovább a növények.



23. ábra: A karalábé növények fejlődése szilárd MS táptalajon

#### 5.4. Flow citometria eredményeink

Áramlási citometria vizsgálatot végeztünk a hibridek relatív genomméretének meghatározására. A mérések eredményeit a négy standard (orankin, karalábé, F1 steril, F1 fertil) és a négy narancs gént tartalmazó BC3 egyed (O51 lila, O52 narancs, O52 rózsaszín, O52 pink) esetén a 24. ábra mutatja be, azonban ezek nem tekinthetők végleges értékeknek, mert az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett kit helyett egy speciálisabbat kell alkalmaznunk a mérések során, hogy az egyéb, a levélben jelen lévő és a mérést zavaró anyagok jelenlététől megszabaduljunk.



24. ábra: Az áramlási flow citometria vizsgálat során mért fluoreszcencia értékek (Az ábrán látható értékekből pontos eredmények nem származnak - optimalizálás folyamatban.)

Ahogy korábban is megjegyeztük, ezek a kezdetleges eredmények arra adnak lehetőséget, hogy a relatív genomméretet a vizsgált egyedek esetén meghatározzuk (24. ábra). Az F1 steril a karalábé és az orankin genotípusok hibride. Relatív genomméretét tekintve az orankin és karalábé közötti értéket kell tudnunk meghatározni. Az F1 fertil az F1 steril genomméretének a kétszeresét kell, hogy hordozza. A 24. ábráról mindkét megállapítás leolvasható. Ehhez a négy standard genotípushoz viszonyítjuk a vizsgált négy BC<sub>3</sub> hibrid kiinduló eredményeit. A vizsgált három O52-es egyed közel azonos (155-160) fluoreszcencia értékekkel jellemezhető, amely értékek a karalábé 132-es értékéhez áll a legközelebb. Az F1 fertil egyed átlagos fluoreszcencia értéke 226, ami sokkal magasabb érték, mint az O52-es vizsgált hibrideké, így azt a következtetést vonhatjuk le, hogy már biztosan nem hordozzák együttesen az A - és C genomokat.

## 6. Összefoglalás

A káposztafélék a zöldségnövények közt a harmadik helyet foglalják el a termesztésben, ami a világ zöldségtermesztésben 10%-ot jelent. Napjainkban a funkcionális élelmiszereknek számító színes zöldségfélék különleges megjelenésük mellett egészségmegőrző szerepük miatt is egyre kedveltebbek a fogyasztók körében. Ehhez a trendhez alkalmazkodva a nemesítők az utóbbi évtizedekben több új színes zöldségféléket állítottak elő.

A narancssárga belső levelű fejes káposzta előállítását Dr. Galli Zsolt Brassica nemesítő nevéhez fűződik. Előállítását a narancssárga orankin (*B. rapa*) többféle káposztafélével való keresztezésével kezdte meg. Ezek közül a keresztezett partnerek közül a karalábé (*B. oleracea*) hozott sikert. Így az eredeti két szülő ebben a nemesítésben az orankin és a karalábé. Embriómentés módszer alkalmazásával egy steril F1 hibridet sikerült létrehozni, mely több év elteltével egy fertilis oldalhajtást fejlesztett feltételezhetően spontán endomitózis következtében, amelyet sikerült gyökereztetni és felnevelni. Következő lépésben a keresztezési partnerek Bridge növények voltak, amik segítségével felnevelésre került a BC<sub>3</sub>-as populáció.

Jelenleg a nemesítési folyamat a BC<sub>4</sub> generációnál tart, azaz a BC<sub>3</sub> –as hibridek anyai partnerként szerepelnek, míg a káposztafélék a pollenszülők. Összesen 37 keresztezésből 12 esetben gyűjtöttünk be összesen 78 becőt, amiből 9 keresztezés esetén (O69, O83, O86, O87, O88, O91, O94, O95, O96 és O98) összesen 253 magkezdeményt helyeztünk embryo-rescue táptalajra. Három keresztezésnél (O70, O71, O80) a becő abortált magkezdeményeket tartalmazott. Eddig húsz BC<sub>4</sub> hibrid csíranövényt kaptunk, ami összesen hét keresztezésből (O83, O86, O87, O88, O94 és O96, O98) származik. Ezek jelenleg növekednek 2/3 cukortartalmú MS táptalajon, fejlődésüket detektáljuk. Megfelelő érettség esetén akklimatizálást követően kiültetésre kerülnek.

DNS alapú vizsgálataink megállapították, hogy a BC<sub>3</sub> egyedek közül az O52 narancs, az O52 rózsaszín és az O51 lila is hordozza a narancs gént. Összesen négy COS marker közül három kiértékelhető eredményt adott, így megállapítottuk, hogy mindhárom marker esetén az O52 narancs, O52 pink, O52 fehér, O52 smaragd és O52 ciklámen C genomra jellemző fragmentumot mutat. Az O52 piros és O52 rózsaszín a COS264 markerrel az A és C genomra utaló DNS szakaszt hordozza. Az O51-es vizsgált genotípusok mind a három COS marker esetén két fragmentumot mutattak. Számunkra a C genomra jellemző DNS szakaszt hordozó BC<sub>3</sub> hibridek a legígéretesebbek.

A relatív genomméret vizsgált során csupán kezdetleges eredményeket kaptunk, azonban megállapítottuk, hogy a négy standard genotípushoz viszonyítva a vizsgált négy BC<sub>3</sub> hibrid közül három O52-es egyed közel azonos (155-160) fluoreszcencia értékekkel jellemezhető, amelyek a karalábé 132-es értékéhez állnak a legközelebb. Az F<sub>1</sub> fertil egyed átlagos fluoreszcencia értéke 226, ami sokkal magasabb érték, mint az O52-es vizsgált hibrideké, így azt a következtetést vonhatjuk le, hogy már biztosan nem hordozzák együttesen az A - és C genomokat.

A BC<sub>3</sub> egyedekkel kapott vizsgálataink eredménye összegezve a következő: az O52 pink és O52 narancs hordozza a *B. rapa* eredetű narancs mutáns gént. A három COS markerrel C genomra jellemző fragmentumot ad és az áramlási citometria kezdetleges átlagos fluoreszcencia értéke (155) közelít a kontroll karalábé értékéhez (132). A laboratóriumba érkezett O52 pink eredetű O91 és O93 keresztezés becőiből származó magkezdemények még nem pattantak meg. Ennek ellenére az O52 narancstól származó magkezdemények közül (O94, O95, O96) már három csíranövényünk van. Mivel ezekben a keresztezésekben (O91, O93, O94, O95, O96) az O52 pink, vagy az O52 narancs az anyai genotípusok és a pollen szülők káposztafélék, így ez az eredmény arra utal, hogy az említett két BC<sub>3</sub>- as egyed kromoszómaszáma valószínűleg „beállt/megállapodott”. A növények fenotípusos megfigyelését az elvirágzásukat követően is folytatjuk. Eredményeink azt mutatják, hogy egyre közelebb kerülünk a narancssárga belső levelű fejes káposztához.

## 7. Irodalomjegyzék

1. Acquaah, G. (2012): Molecular breeding. In: Acquaah, G. (ed.): Principles of Plant Genetics and Breeding Second edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 732p., 383-470. p
2. Chawla, H. S. (2002): Types of culture. Molecular markers and marker-assisted selection. In: Chawla, H. S. (ed.): Introduction to Plant Biotechnology Second Edition, Science Publishers, Inc., Plymouth, 528 p., 27-39. p., 329-359. p.
3. Chernys, J. & Zeevaart, J. (2000): Characterization of the 9-cis- epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. Plant Physiology, 124: 343-354
4. Crisp, P., Walkey, D.G.A., Bellman, E., Roberts, E., (1975): A mutation affecting curd colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* DC). Euphytica 24, 173–176.
5. Czinege D. C. (2020): Színes káposztafélék mutációinak és inkompatibilitás kapcsolatának vizsgálata karfiolban és kínai kel hibridben. Diplomamunka, SZIE, Gödöllő, 63 p
6. Csapó, J. & Csapóné, K. Zs. (2003): Karotinoid színezékek. In: Csapó, J. & Csapóné, K. Zs. (szerk.): Élelmiszer-kémia. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 353 p., 211. p.
7. Donaldson, M. S. (2004): Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. Nutrition Journal, 3:19
8. Feng, H., Li, Y., Liu, Z. & Liu, J. (2012): Mapping of or, a gene conferring orange color 59nt he inner leaf of the Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Molecular Breeding, 29: 235–244
9. Galli Zs. (2023): Szóbeli közlés. Gödöllő, növénynevelő
10. Gautam, M., Ge, X. & Li, Z. (2014). Brassica. In: Pratap, A., Kumar, J. (ed.): Alien Gene Transfer in Crop Plants Volume 2. Springer-Verlag New York Inc., New York, 424 p., 207–229. p
11. Gubicskóné Dr. Kisbenedek Andrea (2015): Biotechnológia in Élelmiszer biztonság
12. Gul, K., Tak, A., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B. & Wani, A. A. (2015): Chemistry, encapsulation, and health benefits of  $\beta$ -carotene -A review. Cogent Food & Agriculture, 1
13. Gupta, S. K. & Pratap, A. (2007) History, origin and evolution. In: Gupta, S. K. (ed.): Advances in botanical research-rapeseed breeding, Springer, Berlin, 464p., 1–20. p.
14. Heszky, L. (2005): Szexuális reprodukció biotechnikai és alkalmazásuk. In: Heszky, L., Fésüs, L. & Hornok L. (szerk.): Mezőgazdasági Biotechnológia, Agroinform Kiadó, Budapest, 366 p., 146-156. p.
15. Heszky, L. (2014): II. A szaporodás biotechnológiája. In: Dudits, D. & Heszky, L. (szerk.): Növényi biotechnológia és géntechnológia, Agroinform Kiadó, Budapest, 334 p., 38-228. p

16. Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G. & Schwarzenberger, K. (2012): Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(10): 1-6.
17. Jámborné Benczúr Erzsébet: A táptalaj; A mikroszaporítás szakaszai és módjai in *Kertészeti növények mikroszaporítása Szerkesztette: Jámborné Benczúr Erzsébet - Dobránszki Judit 2005*
18. Jourdan PS, Earle ED (1989) Genotypic variability in the frequency of plant regeneration from leaf protoplasts of four Brassica spp. and Raphanus sativus. *J Am Soc Hortic Sci* 114:343 349
19. Kiss, E. (2005): Molekuláris növényenyvesítés. In: Heszky, L., Fésüs, L. & Hornok L. (szerk.): *Mezőgazdasági Biotechnológia, Agroiinform Kiadó, Budapest, 366 p., 196-197. p*
20. Korbie, D. J. & Mattick, J. S. (2008): Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 3(9): 1452-1456.
21. Lee, S., Lee, S. C., Byun, D. H., Lee, D. Y., Park, J. Y., Lee, J. H., Lee, H. O., Sung, S. H., & Yang, T. J. (2014): Association of molecular markers derived from the BrCRTISO1 gene with prolycopene-enriched orange-colored leaves in Brassica rapa. *TAG. Theoretical and applied genetics*, 127: 179–191.
22. Lillo C, Olsoen JE (1989) Growth and shoot formation in protoplast-derived calli of Brassica oleracea spp. acephala and spp. capitata. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 17:91 100
23. Mayne, S. T. (1996): Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *The FASEB Journal*, 10: 690–701
24. Niyogi, K. (1999): Photoprotection revisited. *Annual review of plant biology*, 50: 391-417
25. Prakash, S., Bhat, S. R., Quiros, C. F., Kirti, P. B. & Chopra, V. L. (2009): Brassica and its close allies: cytogenetics and evolution. *Plant Breeding*, 31: 21–187
26. Podsedeck, A. (2007): Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 1-11.
27. Pongrácz E. (2021): A kínai kel narancssárga mutációjának átvitele káposztafélékbe embriómentéssel. TDK dolgozat, MATE, Gödöllő,
28. Poór K. (2023): Marker alapú szelekció a narancssárga fejeskáposzta előállításában. Szakdolgozat, MATE, Gödöllő.
29. Schmidt, R. & Bancroft, I. (2011): Perspectives on Genetics and Genomics of the Brassicaceae. In: Schmidt, R. & Bancroft, I. (ed.): *Plant genetics and genomics: crops and models 9. – Genetics and genomics of the Brassicaceae*, Springer, New York, 677p., 617-632. p.
30. Smith, H. R. (2000). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. California: Academic Press.
31. Su, T., Yu, S., Zhang, J. W. F., Yu, Y., Zhang, D., Zhao, X. & Wang, W. (2015): Loss of Function of the Carotenoid Isomerase Gene BrCRTISO Confers Orange Color to the Inner Leaves of Chinese Cabbage (Brassica rapa L. ssp. pekinensis). *Plant Molecular Biology Reporter*, 33: 648-659.

32. Unlu, N. Z., Bohn, T., Francis, D., Clinton, S.K. & Schwartz J. (2007): Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high- $\beta$ -carotene varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1597-1603.
33. Watanabe, M., Musumi, K. & Ayugase, J. (2011): Carotenoid pigment composition, polyphenol content, and antioxidant activities of extracts from orange-colored Chinese cabbage. *LWT – Food Science and Technology*, 44(9): 1971-1975.
34. Wills, R. B. H. & Ranga, A. (1996): Determination of carotenoids in Chinese vegetables. *Food Chemistry*, 56: 451-455.
35. [http1:https://www.nak.hu/images/2024/ELIP/5.Elelmiszerfeldolgozasvertikalis/1.Mezogazdasagitermelesalapanyag/2023-as\\_kertszeti\\_sszeffoglal.pdf](https://www.nak.hu/images/2024/ELIP/5.Elelmiszerfeldolgozasvertikalis/1.Mezogazdasagitermelesalapanyag/2023-as_kertszeti_sszeffoglal.pdf)
36. [http2 Breeding healthy vegetables in times of climate change.  
https://www.syngenta.com/en/innovationagriculture/our-stories/healthy-vegetables-climate-change](https://www.syngenta.com/en/innovationagriculture/our-stories/healthy-vegetables-climate-change)
37. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/6-benzylaminopurine>

## 8. Mellékletek

### 1. számú melléklet: ORA keresztezési lap

| Dátum        | keresz-<br>tezés<br>sor-<br>száma | ANYA Plot | APA Plot | Szükséges<br>becsszám | Dátum és keresztezett bimbók |                |                 |           |          | MEGJEGYZÉS!                 |
|--------------|-----------------------------------|-----------|----------|-----------------------|------------------------------|----------------|-----------------|-----------|----------|-----------------------------|
| 2024.02.06   | O69                               | 24W0601   | 23W0014  | 20                    | 4,5,7,5(02.08)               | x              |                 |           |          | Anya elvirágzott            |
|              | O70                               | 24W0601   | 23W0025  | 20                    | 3,3,5,4,5,5(02.08)           | x              |                 |           |          | Anya elvirágzott            |
|              | O71                               | 24W0601   | 23W0032  | 20                    | 4,6,3,3,2,2(02.08)           | x              |                 |           |          | Anya elvirágzott            |
|              | O72                               | 24W0601   | 23W0041  | 20                    | 5,3,12(02.08)                | x              |                 |           |          | Anya elvirágzott            |
| 2024.02.26   | O73                               | 24W0610   | 24W0602  | 20                    | 16(02.27)                    | 14(03.07)      |                 |           |          | nincs v.por                 |
|              | O74                               | 24W0612   | 22W0506  | 20                    | 5,8,4(03.05)                 | x              |                 |           |          | hűtött pollen. Nincs pollen |
|              | O75                               | 24W0614   | 22W0506  | 20                    | 26(03.05)                    | x              |                 |           |          | hűtött pollen. Nincs pollen |
|              | O76                               | 24W0618   | 22W0506  | 20                    | 14(03.05)                    | x              |                 |           |          | hűtött pollen. Nincs pollen |
|              | O77                               | 24W0610   | 23W0008  | 20                    | 17(02.27)                    | 19(03.07)      | 2,3,2,4(04.04.) |           |          |                             |
|              | O78                               | 24W0610   | 23W0010  | 20                    | 19(02.27)                    | 13(03.07)      | x               |           |          | nincs pollen                |
|              | O79                               | 24W0610   | 23W0014  | 20                    | 16(02.27)                    | 4,6,3(03.26)   | 1,1,6(04.04)    |           |          |                             |
|              | O80                               | 24W0612   | 23W0018  | 20                    | 16(02.27)                    | 5,6(03.26)     | 10(04.04)       |           |          |                             |
|              | O81                               | 24W0612   | 23W0023  | 20                    | 13,5(02.27)                  | 5,8(03.27)     | 7(04.04)        |           |          | apa elvirágzott 03.26       |
|              | O82                               | 24W0612   | 23W0025  | 20                    | 15(02.27)                    | 19(03.26)      | 4,5(04.04)      |           |          |                             |
|              | O83                               | 24W0614   | 23W0027  | 20                    | 27(03.05)                    | 8,13(03.27)    |                 |           |          | hűtött pollen               |
|              | O84                               | 24W0614   | 23W0032  | 20                    | 24(02.27)                    | 9,12(03.26)    | 5,3(04.04)      |           |          |                             |
|              | O85                               | 24W0614   | 23W0030  | 20                    | 23(02.27)                    | 8,13(03.26)    | 5,4(04.04)      |           |          |                             |
|              | O86                               | 24W0618   | 23W0030  | 20                    | 7,14(02.28)                  | 23(03.26)      | 8,6(04.04)      |           |          |                             |
|              | O87                               | 24W0618   | 23W0041  | 20                    | 13,5(02.28)                  | 13,12(03.26)   | 4,7(04.04)      |           |          |                             |
|              | O88                               | 24W0618   | 23W0042  | 20                    | 16,7(02.28)                  | 19(03.26)      | 7,6(04.04)      |           |          |                             |
| 2024.03.12   | O89                               | 24W0613   | 22W0506  | 20                    | 23(03.12)                    | x              |                 |           |          | nincs pollen                |
| Nem kell!!!! | O90                               | 24W0613   | 22W0506  | 20                    | xxxxxxxxxxxxxx               | xxxxxxxxxxxxxx |                 |           |          | ugyan az mint az O89        |
|              | O91                               | 24W0613   | 23W0008  | 20                    | 25(03.12)                    | 21(03.27)      | 13(04.09)       |           |          | most nem volt v.por (lesz)  |
|              | O92                               | 24W0613   | 23W0010  | 20                    | 24(03.12)                    | 13(03.27)      |                 |           |          | nincs pollen                |
|              | O93                               | 24W0613   | 23W0014  | 20                    | 15(03.12) hűtött p.          | 23(03.12)      | 22(03.27)       | 17(04.04) | 6(04.09) |                             |
|              | O94                               | 24W0616   | 23W0018  | 20                    | 17,5(03.12)                  | x              |                 |           |          | Anyán nincs bimbó.          |
|              | O95                               | 24W0616   | 23W0023  | 20                    | 12,11(03.12)                 | x              |                 |           |          | Anyán nincs bimbó.          |
|              | O96                               | 24W0616   | 23W0025  | 20                    | 7,15(03.12)                  | x              |                 |           |          | Anyán nincs bimbó.          |
| 2024.03.18   | O97                               | 24W0616   | 22W0506  | 20                    | x                            | x              |                 |           |          | anyan nincs bimbó           |
|              | O98                               | 24W0619   | 22W0506  | 20                    | 29,18(03.22)                 | x              |                 |           |          | Nincs virágpor.             |
| 2024.04.02   | O99                               | 24W0611   | 22W0506  | 20                    |                              |                |                 |           |          | Nincs virágpor.             |
|              | O100                              | 24W0615   | 22W0506  | 20                    |                              |                |                 |           |          | Nincs virágpor.             |
|              | O101                              | 24W0617   | 22W0506  | 20                    |                              |                |                 |           |          | Nincs virágpor.             |

2. számú melléklet: A szilárd embryo-rescue táptalaj összetevői

| Komponensek                                          | menyiség (mg/l) |
|------------------------------------------------------|-----------------|
| Makroelem összetétel (1000ml)                        |                 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 134             |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 3000            |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O | 150             |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 500             |
| CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O                | 750             |
| Mezoelem összetétel (1000ml)                         |                 |
| FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                 | 27,8            |
| Na-EDTA                                              | 37,3            |
| Mikroelem összetétel (1000ml)                        |                 |
| MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O                 | 10              |
| ZnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O                 | 2               |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 3               |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O | 0,25            |
| CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O                | 0,025           |
| CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O                | 0,025           |
| Vitaminok összetétel (1000 ml)                       |                 |
| Thiamine HCl                                         | 10              |
| Nicot.acd HCl                                        | 1               |
| Pyridoxine HCl                                       | 1               |
| Myo-inozitol                                         | 100             |
| Aminosavak                                           |                 |
| Glutamin                                             | 800             |
| Szerin                                               | 100             |
| Fitohormonok                                         |                 |
| 6-BAP                                                | 0,2             |
| IAA                                                  | 0,2             |
| Szaharóz                                             | 20000           |
| Inozitol                                             | 100             |
| Agar                                                 | 8000            |

3. számú melléklet: A szilárd 2/3 cukortartalmú MS táptalaj összetétel

|                                                     |                                    |         |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------|---------|
| Makroelem összetétel (1000ml)                       |                                    |         |
| Töménység                                           | 1x                                 | 10x     |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1,9 g                              | 19 g    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1,65 g                             | 16,5 g  |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                | 0,37 g                             | 3,7 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 0,17 g                             | 1,7 g   |
| Mezoelem összetétel (1000ml)                        |                                    |         |
| Töménység                                           | 1x                                 | 200x    |
| FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O                | 0,0278 g                           | 5,56 g  |
| Na-EDTA                                             | 0,0373 g                           | 7,46 g  |
| Mikroelem összetétel (1000 ml)                      |                                    |         |
| Töménység                                           | 1x                                 | 1000x   |
| MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O                 | 0,0223 g                           | 22,30 g |
| ZnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O                 | 0,0086 g                           | 8,60 g  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 0,0062 g                           | 6,20 g  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,00025 g                          | 0,25 g  |
| CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O                | 0,000025 g                         | 0,025 g |
| CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O                | 0,000025 g                         | 0,025 g |
| Vitamin összetétel (1000 ml)                        |                                    |         |
| Töménység                                           | 1x                                 | 1000x   |
| Thiamine, B1                                        | 0,0001 g                           | 0,10 g  |
| Nicot.acd, B3                                       | 0,0005 g                           | 0,50 g  |
| Pyridoxine, B6                                      | 0,0001 g                           | 0,10 g  |
| Glycine                                             | 0,002 g                            | 2,00 g  |
| Szaharóz                                            | 20 g (MS táptalaj esetében<br>30g) |         |
| Inozitol                                            | 0,1 g                              |         |
| Agar                                                | 8 g                                |         |

4. számú melléklet: MS táptalaj törzsoldatainak koncentrációja 1 liter táptalajhoz

| Törzsoldat        | Koncentráció | Mennyiség (ml/l) |
|-------------------|--------------|------------------|
| Makro             | 10x          | 50               |
| Mezo              | 200x         | 5                |
| Mikro             | 1000x        | 1                |
| Vitaminok         | 1000x        | 1                |
| KI                | 1000x        | 1                |
| CaCl <sub>2</sub> | 1000x        | 1                |

## 5. számú melléklet: NucleoSpin DNS izolálás folyamata

1. Minták homogenizálása (Homogenize sample): 100 mg levélmintát homogenizálni dörzsmozsárban folyékony nitrogén adagolása mellett, amíg finom por nem keletkezik.
2. /a. Sejtek lizálása (Cell lysis using Buffer PL1): a finom por áthelyezése 2 ml-es Eppendorf csőbe, majd 400 µl PL1 puffer hozzáadása és alapos vortexelés, amíg egynemű nem lesz a folyadék. Majd 10 µl RNase A hozzáadása. Ezt követően ismét vortexelés. Utolsó lépésben 10 percig 65 °C-os vízfürdőben történő inkubáció, miközben kétszeri vortexelést végezése. Majd a legvégén centrifugálás.
3. Minták homogenizálása (Homogenize sample): 100 mg levélmintát homogenizálni dörzsmozsárban folyékony nitrogén adagolása mellett, amíg finom por nem keletkezik.
4. Sejtek lizálása (Cell lysis using Buffer PL1): a finom por áthelyezése 2 ml-es Eppendorf csőbe, majd 400 µl PL1 puffer hozzáadása és alapos vortexelés, amíg egynemű nem lesz a folyadék. Majd 10 µl RNase A hozzáadása. Ezt követően ismét vortexelés. Utolsó lépésben 10 percig 65 °C-os vízfürdőben történő inkubáció, miközben kétszeri vortexelést végezése. Majd a legvégén centrifugálás.
5. Lizátum tisztítása/szűrése (Filtration/Clarification of crude lysate): gyűjtőcsőben violaszínű membrán gyűrűt elhelyezni, és a lizátumot ráönteni. 11000 x fordulaton 2 perc centrifugálás.
6. DNS kötődést biztosítása (Adjust DNA binding conditions): a folyékony oldatot egy új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe önteni, a pellet a gyűjtőcsőbe maradjon. Hozzáadni 450 µl PC puffert, majd vortexelni, amíg egy fázis nem lesz.
7. DNS megkötése a membránon (Bind DNA): egy új gyűjtőcsőbe helyezni a zöldszínű membránt, a mintát beleönteni (ha kel, akkor két részletben, mert a térfogat maximum 700 µl lehet, ezután 1 percig 11000 x fordulaton centrifugálni és az átfolyt folyadékot kiönteni.
8. Membrán mosása és szárítása (Wash and dry silica membrane):
  - 1. mosás: hozzáadni a membránon lévő fragmentumra 400 µl PW1 puffert, és 1 percig 11000 x fordulaton centrifugálni. Az átfolyt folyadékot kiönteni.
  - 2. mosás: 700 µl PW2 puffert pipetázni a membránra, és 1 percig 11000 x fordulaton centrifugálni, az átfolyt folyadékot kiönteni.
  - 3. mosás: Hozzáadni 200 µl PW2 puffert és 2 percig 11000 x fordulaton centrifugálni. Az átfolyt folyadékot eltávolítani.
9. DNS leoldása (Elute DNA): a zöldszínű membránt egy új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezni. Ezután 50 µl 65 °C-os PE puffert rámérni, majd inkubálni. Az inkubálási idő 5 perc 65 °C-os hőmérsékleten. Utolsó lépés a centrifugálás 1 percig 11000 x fordulaton.

→ A 7. lépést kétszer kell elvégezni.

6. számú melléklet: Embriómentés eddigi eredményei

| Név | Keresztezés ideje | Beérkezés ideje | Be-cők (db) | Magkezdemenyek (db) | Táptalajra tétel ideje | Megpattadás ideje                      | A növény táptalajra helyezés ideje     |
|-----|-------------------|-----------------|-------------|---------------------|------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| O69 | 2024.02.08        | 2024.03.05      | 3           | 1                   | 2024.03.05             |                                        |                                        |
| O70 | 2024.02.13        | 2024.03.05      | 3           | 0                   |                        |                                        |                                        |
| O71 | 2024.02.13        | 2024.03.05      | 3           | 0                   |                        |                                        |                                        |
| O86 | 2024.02.28        | 2024.03.19      | 6           | 26                  | 2024.03.19             | 1 (04.08.)<br>2 (04.15.)<br>1 (04.22.) | 1 (04.08.)<br>2 (04.15.)<br>1 (04.22.) |
| O87 | 2024.02.28        | 2024.03.19      | 4           | 10                  | 2024.03.19             | 1 (04.08.)<br>1 (04.15.)<br>2 (04.22.) | 1 (04.08.)<br>1 (04.15.)<br>2 (04.22.) |
| O88 | 2024.02.28        | 2024.03.19      | 5           | 19                  | 2024.03.19             | 2 (04.15.)<br>3 (04.22.)               | 2 (04.15.)<br>3 (04.22.)               |
| O94 | 2024.03.12        | 2024.03.25      | 3           | 11                  | 2024.03.25             | 1 (04.15.)                             | 1 (04.15.)                             |
| O95 | 2024.03.12        | 2024.03.25      | 4           | 10                  | 2024.03.25             |                                        |                                        |
| O96 | 2024.03.12        | 2024.03.25      | 8           | 40                  | 2024.03.25             | 1 (04.15.)                             | 1 (04.15.)                             |
| O83 | 2024.03.05        | 2024.04.04      | 5           | 5                   | 2024.04.02             | 1 (04.08.)                             | 1 (04.08.)                             |
| O94 | 2024.03.12        | 2024.04.04      | 3           | 12                  | 2024.04.02             | 1 (04.15.)                             | 1 (04.15.)                             |
| O95 | 2024.03.12        | 2024.04.04      | 3           | 4                   | 2024.04.02             |                                        |                                        |
| O96 | 2024.03.12        | 2024.04.04      | 3           | 10                  | 2024.04.02             |                                        |                                        |
| O86 | 2024.02.28        | 2024.04.08      | 2           | 4                   | 2024.04.08             | 2 (04.22.)                             | 2 (04.22.)                             |
| O87 | 2024.02.28        | 2024.04.08      | 2           | 4                   | 2024.04.08             |                                        |                                        |
| O88 | 2024.02.28        | 2024.04.08      | 2           | 4                   | 2024.04.08             |                                        |                                        |
| O98 | 2024.03.22        | 2024.04.08      | 4           | 29                  | 2024.04.08             | 1 (04.22.)                             | 1 (04.22.)                             |
| O80 | 2024.04.04        | 2024.04.22      | 2           | 0                   |                        |                                        |                                        |
| O93 | 2024.03.27        | 2024.04.22      | 3           | 5                   | 2024.04.22             |                                        |                                        |
| O91 | 2024.03.27        | 2024.04.22      | 3           | 10                  | 2024.04.22             |                                        |                                        |
| O98 | 2024.03.22        | 2024.04.22      | 4           | 42                  | 2024.04.22             |                                        |                                        |
| O88 | 2024.03.26        | 2024.04.22      | 3           | 7                   | 2024.04.22             |                                        |                                        |

## **9. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Dr. Tóth-Lencsés Andrea Kittinek, Dr. Galli Zsoltnak és Czinege Dórának, kik tudásukkal, segítségükkel, idejükkel és szakértelmükkel támogatták munkámat. Ezen felül szeretném megköszönni Polgári Dávidnak, hogy biztosította számomra a kutatási munkámhoz szükséges vizsgálatot Martonvásáron. Valamint köszönöm a Genetika és Genomika tanszék többi munkatársának segítőkészségét, akikhez kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam.