

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Genetika és Biotechnológiai Intézet
Mezőgazdasági Biotechnológus MSc.

**KODOMINÁNS MOLEKULÁRIS MARKER FEJLESZTÉSE A 'LILA MUTÁCIÓRA'
KARFIOLBAN**

Készítette: Bedzsó Gabriella

Belső konzulensek: Dr. Kiss Erzsébet, egyetemi tanár, intézetvezető
Katuláné Debreceni Diána, Ph.D
Külső konzulens: Galli Zsolt, Ph.D
Syngenta Seeds Kft. Ócsa

Gödöllő
2012.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzés	3
2.	Irodalmi áttekintés.....	4
2.1	A karfiol származása, elterjedése	4
2.1.1	Színes karfiolok jellemzése	5
2.2	A lila karfiol fenotípusos jellemzése	6
2.3	Flavonoidok.....	8
2.3.1	Az antocián bioszintézis út.....	8
2.3.2	A lila színért felelős antociánok	10
2.4	Pr (purple – lila) gén.....	11
2.5	Különböző mutációk összehasonlítása	14
2.6	Harbinger DNS transzpozon	16
2.7	A PCR technika	17
2.8	Vörös káposzta	18
3.	Anyag és módszer	20
3.1	Növényanyag.....	20
3.2	DNS izolálás.....	20
3.3	Tervezett primerek	21
3.4	PCR körülmények	24
4.	Eredmények és megvitatásuk	25
4.1	Molekuláris markerek tervezése és alkalmazása.....	25
4.2	Lila fenotípus elkülönítése	28
4.3	Lila genotípusok elkülönítése.....	29
5.	Értékelés és következtetések	33
6.	Összefoglalás	34
7.	Irodalomjegyzék	35
8.	Köszönetnyilvánítás	39
9.	Melléklet	40
10.	Nyilatkozat.....	41

1. Bevezetés és célkitűzés

A fogyasztói döntést elsősorban a szín befolyásolja, amely a gyümölcsök és zöldségek egyik legfontosabb minőségi jellemzője (Volden *et al.*, 2008). Az emberek számára egyre fontosabbá válik, hogy egészséges ételek fogyasztásával hozzájáruljanak az egészségük megőrzéséhez.

Hou (2003) vizsgálataival bizonyította, hogy az antocián tartalmú termékek fogyasztása antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásuk miatt csökkentik a szív- és érrendszeri betegségek kialakulását, számos krónikus betegség és a rák kockázatát. A lila karfiolban az antocián tartalom igen kiemelkedő, megközelítőleg 375mg/100g, hasonlóan, mint az áfonyában. A gyümölcsök antioxidáns hatású anyagaik a színyanyagok és a C-vitamin, ezek gyökfogó kapacitásuk révén semlegesítik a szervezetben a különböző káros anyagokat.

Chiu és munkatársai (2010) kísérleteiből kiderült, hogy a 'lila mutáció' kialakulását a karfiolban *Harbinger DNS transzpozon* inszerció okozza, amely az antocián bioszintézisben részt vevő gének működését befolyásolja. Ez felelős a gének túlexpresszáldásáért, és az így kialakult lila színű fenotípusért (Chiu *et al.*, 2010).

A nemesítők számára a heterozigóta és homozigóta lila karfiol genotípusok elkülönítése nem mindig könnyű feladat. A sötétlila rózsával rendelkező növényről biztosan megállapítható, hogy az homozigóta, de a világosabb lila fejek is lehetnek homozigóták a rózsza színeződésétől függetlenül, feltételezhetően modifikátor gének hatásának következtében.

TDK dolgozatunk célja olyan kodomináns molekuláris marker kifejlesztése és alkalmazása volt, a különböző genotípusok molekuláris elkülönítését elősegíti. A kodomináns molekuláris markerek alkalmazásának egyik nagy előnye, hogy a tervezett primerek segítségével a növényeket már korai fenológiai fázisban szelektálni tudja a növény-nemesítő. A PCR és a gélelektroforézis megbízható genetikai vizsgálati módszerek, ezek használatával idő és pénz takarítható meg, ami a nemesítésben különösen fontos szempont. További céljaink közé tartozik a vörös káposztában is az antocián bioszintézisben részt vevő gének vizsgálata és a molekuláris háttér feltérképezése.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A karfiol származása, elterjedése

A karfiol (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) a káposztafélék között az egyik legkésőbb termesztésbe vont változat. A mediterrán régió belül a karfiol diverzitás egyik legfontosabb központja Olaszország, a 16-17. században innen került a karfiol növény a többi európai országba. Hazai fogyasztása nem jelentős (0,5 kg/fő/év). Egyéves növény, húsosan megvastagodott virágzati kezdeményét, azaz a karfiolrózsát fogyasztjuk (Pék *et al.*, 2007) (1. ábra).



1. ábra: Változatos színű karfiolok. (Készítette: Dr. Galli Zsolt, Syngenta Seeds, Ócsa)

A zöldségek, és gyümölcsök alapvető része az emberi étrendnek. Fontos forrásai a szükséges vitaminoknak, és nagy mennyiségben tartalmazznak az emberi szervezet számára fontos rostokat (Chiu *et al.*, 2010). A karfiolnak kiváló étrendi hatása van, emellett jelentős mennyiségű C-vitamint is tartalmaz (Pék *et al.*, 2007).

Napjainkban az emberek egyre nagyobb érdeklődést mutatnak a színes zöldségek és gyümölcsök iránt (Acciarri *et al.*, 2008). A színes növényi szövetek nagy mennyiségben tartalmazznak az ember számára fontos és nélkülözhetetlen növényi színanyagokat, melyeknek egészségmegőrző hatásuk is említésre méltó.

Az első lila színű rózsát fejlesztő mutáns karfiol növényt 1970-ben Dániában azonosították. A lila karfiol nemesítése is itt kezdődött el Daehnfeldt nemesítő cég által. A Dániában és később dél-Spanyolországban is folyó nemesítési munka, megközelítőleg 20 évig tartott. 2007-ben ezt a nemesítési projektet áthelyezték Magyarországra, Ócsára; miután a Syngenta felvásárolta a dán céget.

2.1.1 Színes karfiolok jellemzése

A narancssárga karfiol jelentős mennyiségű béta-karotint tartalmaz, melyből A-vitamint állít elő az emberi szervezet. Fontos megelőző hatása van a farkasvaksággal, és számos érrendszeri betegséggel szemben. Rendszeres fogyasztásával csökkenthető a rák kialakulásának kockázata (Li *et al.*, 2007) (**2. ábra**).

A zöld karfiol, a karfiol és a brokkoli hibridje. A *Brassica* családhoz tartoznak, így kompatibilisek az egymással való keresztezéshez. A zöld karfiolnak édes íze van. Állaga puha, mégis szilárd, mint a brokkoli, de a karfiolhoz képest kevésbé omlós. Már 1988-ban is állítottak elő karfiol-brokkoli hibridet, melynek a „broccoflower” nevet adták (internet 1) (**2. ábra**).

A romanesco karfiol (csúcsos karfiol) nagy dilemma, hogy brokkoli vagy karfiol, „Romanesco broccoli” vagy „Romanesco cauliflower” néven illetik őket. Kitűnő C-vitamin forrás. Az íze kissé fűszeres. Spirális csúcsos rózsája megragadja a tekintetet (internet 2) (**2. ábra**).

A fő karfiol termesztő és fogyasztó területeken azonban egyelőre a fehér vagy a krémszínű karfiol az elfogadott (Crisp *et al.*, 1974).



2. ábra: Színes karfiolok. (Készítette: Dr. Galli Zsolt, Syngenta Seeds, Ócsa)

2.2 A lila karfiol fenotípusos jellemzése

A *Purple* (*Pr*) gén – amely részt vesz az antocián bioszintézisben - mutációja abnormális antocián felhalmozódást okoz a karfiol rózsájában (**3. ábra**). Ennek a mutációnak köszönhetően egy érdekes és egyedülálló mutáns fenotípus alakul ki. Ennél az új fenotípusnál intenzív lila színű karfiolrózsa és lila színeződésű szövetek figyelhetők meg (Chiu *et al.*, 2010). Az alábbi allélok fordulhatnak elő:

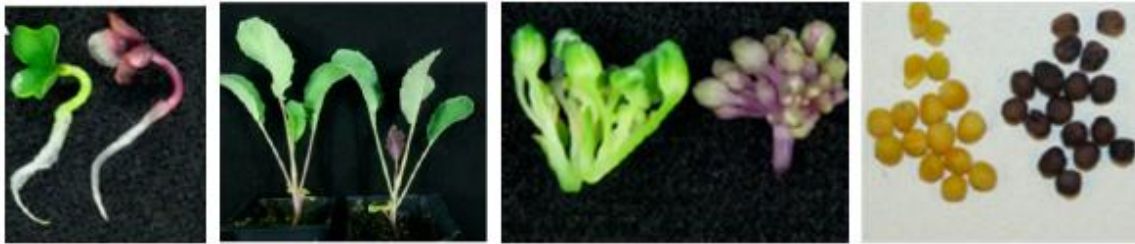
- *Pr-D* allél (mutációt hordozó allél)
- *pr* allél (vad típusú allél)



3. ábra: A *Pr* génben történő mutáció által okozott antocián felhalmozódás karfiolban. (Készítette: Dr. Galli Zsolt)

Szabadföldi és üvegházi kísérletekkel igazolták, hogy a mutációt hordozó lila fenotípusú karfiolok a fehér, hagyományos karfiolhoz hasonlóan normális ütemben nőnek és fejlődnek megfelelő termesztési körülmények között szabadföldön és üvegházban egyaránt (Chiu *et al.*, 2010). A megfelelő körülmények biztosítása ellenére a narancssárga karfiolok homozigóta és heterozigóta formái között növekedésbeli különbség figyelhető meg. A heterozigóta narancssárga karfiol rózsája normál méretű, a homozigóta karfiolok törpe (dwarf) növekedést mutatnak (**8. ábra**) (Li *et al.*, 2001).

A lila mutáns egyedekben szövet-specifikus antocián felhalmozódás figyelhető meg. Az intenzív lila színeződés leginkább a karfiolrózsában, és fiatal szövetekben, például a magoncok, a nagyon fiatal levelek, a virágrügyek, valamint a mag endospermium szövetekben figyelhető meg (**4. ábra**). Az idősebb leveleken és a szárban ez az intenzív lila színeződés általában nincs jelen.



4. ábra: Fehér és lila karfiol növényi részek fenotípusos összehasonlítása. Balról jobbra: öt napos magoncok, három hetes növények, fiatal virágrügyek, mag endospermiumok. (Chiu *et al.*, 2010)

A lila karfioloknál érdekes jelenség figyelhető meg, ugyanis a virágszirmokban nem halmozódik fel antocián, annak ellenére, hogy a növényvilágban ez az egyik leggyakoribb antocián felhalmozó szövet. (Chiu *et al.*, 2010)

Antociánok termelődhetnek természetes „válaszként” is, különböző stressz körülményekre. Ilyen stressz-körülmény lehet például erős UV fény, tartós tápanyaghiány, vagy alacsony hőmérséklet (Dugassa *et al.*, 2006). Ilyenkor az antocián képződés együtt jár egyéb látható nem kívánatos hatásokkal, mint például visszamaradottság a növekedésben, vagy a levélen kialakuló klorózis (Yuan *et al.*, 2009).

HPLC vizsgálatok során lila karfiol fiatal levelekben, rózsában és magokban magas antocián tartalmat detektáltak. A lila karfiolrózsa megközelítőleg 375 mg /100 g cianidin-diglükózidot tartalmaz ellentétben a vad típusú fehér karfiollal, ahol szinte észrevehetetlen mennyiségű antocián képződik (Chiu *et al.*, 2010).

Az antociánok különböző csoportjai találhatók meg a növényekben:

- sárga szín: *pelargonidin 3-glükózid*
- lila szín: *cianidin 3-glükózid*
- kék szín: *delfinidin 3-glükózid* (Heszky *et al.*, 2005).

A mutáns lila karfiolban lévő antocián összetevőit elkülönítették a karfiolrózsában, és két fő összetevőt azonosítottak:

- cianidin 3-(kumaril-caféyl)
- glükózid-5-(malonil) glükózid (Chiu *et al.*, 2010).

2.3 Flavonoidok

A flavonoidok a növényi metabolizmus másodlagos termékei, antioxidáns tulajdonságú növényi hatóanyagok. A flavonoidok elágazó bioszintézis úton szintetizálódnak. A bioszintézis út során kialakulnak színtelen és színes pigmentek is. Koes és munkatársai (2005) kísérleteik során megállapították, hogy a pigmentek lazán kötődnek az endoplazmatikus retikulumhoz, mert valószínűleg multienzim-komplexekeket alkotnak, így ezek a vakuólumban és a sejtfalban halmozódhatnak fel. A legtöbb növény esetében a pigmentáció csak néhány specifikus szövetre korlátozódik, amit egyéb külső és belső faktorok is szabályoznak, mint például a fény.

A flavonoidok és a karotinoidok széles körben elterjedt növényi pigmentek. A flavonoidokat együtt alkotja a flavonoid, és az antocián, melyek széles színspektrumot adnak: halványsárga, skarlát vörös, piros, magenta, viola lila, és kék színt kölcsönöznek a virágoknak, zöldeknek és gyümölcsöknek (Tanaka *et al.*, 2008a).

A különböző flavonoidok sokféle biológiai funkciót látnak el a növény életfolyamatai során. A flavonoidok és az antociánok hozzájárulnak a növény védelméhez az UV-B sugárzás ellen (Martens *et al.*, 2003), semlegesítik a szabad gyököket (Tanaka *et al.*, 2008a), védelmet nyújtanak a mikrobiális és a növényi patogénekkel szemben (Koes *et al.*, 2005). Továbbá táplálkozási értékük bizonyítottan kiemelkedő (Martens *et al.*, 2003).

2.3.1 Az antocián bioszintézis út

A különböző fajokban eltérések mutatkoznak az antocián bioszintézis út során pl. kukoricában, tatarokban, és petúniában, a fő reakciók azonban azonosak (5. ábra).

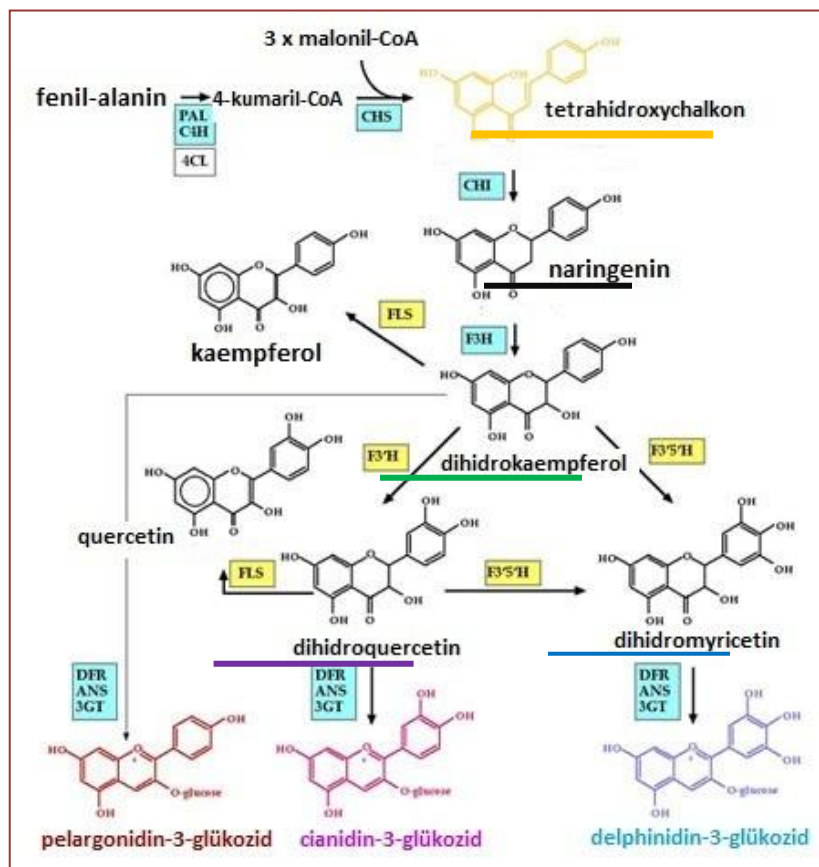
A prekursorok minden flavonoid szintézisnél, beleértve az antociánokat is: a malonil-CoA, és p-kumaril-CoA. Az első lépésben malonil-CoA-ból és p-kumaril-CoA-ból **tetrahidroxichalkon** (a színkódok az 5. ábrán nyomon követhetők) jön létre, ezt a lépést a *chalkon szintáz* (CHS) katalizálja. A *chalkon izomeráz* (CHI) a következő lépésben a sárga színű tetrahidroxichalcon-ból színtelen **naringenint** állít elő. Majd a naringenin a továbbiakban átalakul **dihidrokempferollá** (DHK), *flavanon 3-hidroxiláz* (F3H) közreműködésével.

A **dihidrokempferol** kulcsszerepet játszik az antocián bioszintézisben, további alakulása dönti el a termés, vagy virág végleges színét.

A **DHK** később hidroxilálódhat **dihidrokvercetinné (DHQ)**, flavonoid 3'-hidroxiláz segítségével (F3'H).

Flavonoid 3'5'-hidroxiláz (F3'5'H) közreműködésével a **DHK** **dihidromiricetinné (DHM)** is alakulhat. Az F3'5'H szintén szerepet játszik a **DHQ** → **DHM** átalakulásban. Az utolsó három enzim - **DHK**, **DHQ**, és **DHM** – ahhoz szükséges, hogy a szintelen dihidroflavonolok átalakuljanak antociánná.

Az első enzimátikus átalakítás, amelyben dihidroflavonol reduktója történik flavan-3,4-cisz-diolká (leukoantocianidin) dihidroflavanol 4-reduktáz segítségével (**DFR**) megy végbe. További oxidáció, dehidratáció és glükóziláció, a különböző leukoantocanidineknél **tégla-vörös pelargonidin**, **vörös cianidin** és **kék delfidin** pigmenteket állít elő. Antocianidin 3-glükózidáz tovább módosulhat glükóziláció, és aciláció hatására (Holton *et al.*, 1995).



5. ábra. Az antocián bioszintézis sematikus ábrája. (Forrás: www.florigene.com)

2.3.2 A lila színért felelős antociánok

Az antociánok másodlagos anyagcseretermékek, melyek a magasabb rendű növényekben termelődnek (Tako *et al.*, 2006). Ezek az anyagcseretermékek nemcsak a fent említett védő mechanizmussal bírnak, hanem fontos részét képezik a növényi molekuláris rendszernek, így hozzájárulnak a növények normális fejlődéséhez. A másodlagos anyagcseretermékek képződése gyakran a növény fejlődési fázisának kezdetét jelentik. (Broun, 2005)

Az antociánok fenil-alaninból származó, vízdékony vegyületek, melyek a citoszolban szintetizálódnak, és a vakuólumban halmozódnak fel (Tanaka *et al.*, 2008b). A fogyasztott termékek érettsége és a minősége szempontjából az antocián megfelelő mennyiségű felhalmozódása fontos jellemző (Allan *et al.*, 2008). Az antociánok széles színskálával rendelkeznek (**6. ábra**) (Castaneda-Ovando *et al.*, 2008), ezek a pigmentek alakítják ki a növények lila, kék és piros színeződését (Chiu *et al.*, 2010).



6. ábra: Az antociánok által kialakított színskála. (Forrás: www.florigene.com)

Az emberi szervezet számára fontos, magas antocián tartalmú ételek és italok közé sorolható a fekete áfonya, a vörös káposzta, a lila édesburgonya, a vörösbor, vagy a fekete áfonya kivonat (Hou, 2003); valamint a dolgozatban bemutatott tulajdonságai miatt a lila karfiol is.

Az antociánok hasznosítása jelentős még az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban, a kozmetikai iparban, de csak alacsony arányban vonható ki. Alkalmazásuk korlátozott, mert szerkezetük instabil, az izolált antocián érzékeny, emiatt könnyen lebomlik. Stabilitását különböző faktorok befolyásolják, mint a pH, a tárolási hőmérséklet, a kémiai szerkezet, a koncentráció, a fényhatás, az oxigén mennyisége, vagy az enzimek, flavonoidok, proteinek, és fémionok (Castaneda-Ovando *et al.*, 2008). Egy tanulmányban *Loropetalum chinense* var. *rubrum* (bordólevelű tulipánfa) növényből kivont antocián stabilitását vizsgálták eltérő pH és hőmérséklet hatására. Azt tapasztalták, hogy az antocián alacsony hőmérsékleten stabil marad, a hőmérséklet növekedésével azonban gyorsan degradálódik. Változó pH értékek hatására az antocián színe megváltozik. Kísérletükben 3,0 –ról 7,0 –re emelték a pH-t, eközben az antocián instabillá vált, és eltűnt (Qian-Rui *et al.*, 2003).

Az antociánoknak és egyéb pigmenteknek szerepük van még a növények reprodukzív szabályozásában, feltűnő színükkel csalogatják a rovarokat, így alakítják ki a növények és állatok

közötti interakciót. Az állatok jobban megtalálják az élénk színű gyümölcsöket, így biztosítják a magok szétszóródását (Alla *et al.*, 2008).

2.4 *Pr (purple – lila) gén*

Mutánsok analízise megkönnyítette a gének vizsgálatát és felfedezését, amely így magyarázatot adott az antocián bioszintézisére és szabályozására. Annak ellenére, hogy sok kutatást végeztek az antocián termeléssel kapcsolatban, alig néhány esetben vizsgáltak zöldségnövényt.

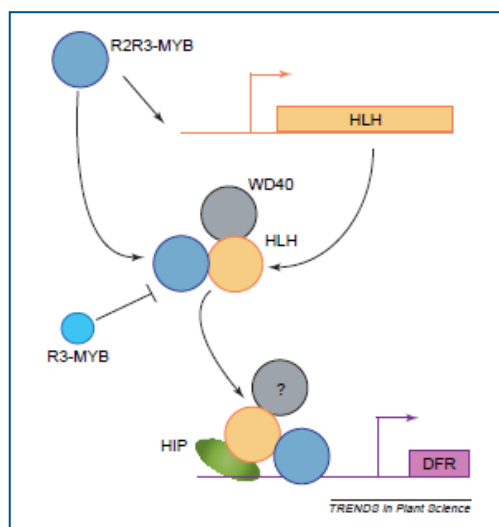
A lila karfiol növények mutációja azért érdekes, mert intenzív antocián termelés következik be az egyébként alacsonyan pigmentált rózsafejekben és magokban - ebben a két gazdaságilag jelentős szervben/szövetben. A karfiol lila mutációjáért egy semi-domináns gén felelős.

Arabidopsis-ban, kukoricában, petúniában, tátikában és más növényfajokban antocián bioszintézist szabályozó géneket, és számos szabályozó faktort azonosítottak már. A fő mechanizmus a struktúrgének transzkripcionális szabályozása, ez határozza meg az antocián bioszintézist a növényekben (Chiu *et al.*, 2010). A struktúrgének megnövekedett expressziója közvetlen kapcsolatba hozható a megnövekedett antocián tartalommal. Számos szabályozó faktor (R2R3 MYB *transzkripciós faktor*, bHLH *transzkripciós faktor*, és WD40 *transzkripciós faktor*) játszik szerepet ebben a folyamatban, szabályozó komplexeket alkotva (7. **ábra**) aktiválják az antocián bioszintézisben szereplő gének expresszióját (Yuan *et al.*, 2009).

A transzkripciós faktorok a DNS transzkripciójában vesznek részt. Olyan fehérjék, amelyek a DNS felületén speciális kötőhelyeket alakítanak ki. A transzkripciós faktorokat egyéb fehérjék aktiválják, vagy kikapcsolják. Leginkább az RNS transzkripció kezdeti szakaszában vannak jelen. Meghatározzák azt a helyet, ahol a DNS „kitekeredik” ahonnan szintetizálódik az egyszálú RNS.

A transzkripciós faktoroknak három fő csoportja van:

- alapfaktorok, melyek komplexeket alkotva meghatározzák az iniciáció helyét;
- upstream faktorok, DNS-kötő fehérjék, növelik az iniciáció hatékonyságát, és a promoter működését;
- indukálható transzkripciós faktorok, a transzkripció tér és időbeli szabályozásáért felelősek (Kiss, 1999).



7. ábra: Az ábrán MYB, bHLH és WD40 transzkripciós faktorok, mint komplex látható az antocián bioszintézis egyik lépésében: DFR gén aktiválása közben. (Koes *et al*, 2005)

A következő fontosabb enzimek vesznek részt az antocián bioszintézisben:

1. R2R3 MYB fehérje (PAP1, PAP2, MYB113, MYB114, MYBL2)
2. bHLH (basic helix-loop-helix) transzkripciós faktor (TT8, GL3, EGL3)
3. WD40 ismétlődő fehérje (TTG1) (Chiu *et al.*, 2010).

1. R2R3 MYB (PAP1, PAP2, MYB113 és MYB114)

Az állatvilággal ellentétben, a növényekben jelen van a MYB-fehérje alcsalád, melyet R2R3-MYB doménnel jellemeznek. A növényekben a MYB faktorok alkotják az egyik legnagyobb MYB gén családot (Stracke *et al.*, 2001). A növényi MYB fehérje transzkripció szabályzó, két (R2 és R3) vagy három (R1, R2, R3) imperfekt ismétlődést tartalmaz.

Az R2R3 MYB fehérjék szabályozzák az antocián bioszintézist (Ramsay *et al.*, 2005), fontos szerepet játszanak a színek kialakításában (Chiu *et al.*, 2010), felelősek az antocián bioszintézis gének működéséért (Grotewold, 2006), és befolyással vannak az epidermisz sejtek sorsára. A klasszikus MYB faktorok részt vesznek a növényi sejtek ciklusában. R2R3- típusú MYB gének fontos szabályozók a növények másodlagos anyagcsere-folyamataiban (Stracke *et al.*, 2001), így az R2R3 MYB transzkripciós faktor működése antocián termeléshez vezet számos antocián felhalmozó növényben (Chiu *et al.*, 2010).

Ezzel szemben, ha az R2R3 MYB működésképtelenné válik, szintelen lesz az egyébként antocián felhalmozó szövet (Walker *et al.*, 2007).

2. bHLH transzkripciós faktor

A bHLH (basic helix-loop-helix) transzkripciós faktorok transzkripciós szabályozó családhoz tartoznak (Heim *et al.*, 2003), melyből már több mint 150 tagot azonosítottak *Arabidopsisban* (Grotewold, 2006). A bHLH domén alap régiója (basic) felelős a szekvencia specifikus DNS kötődésért. Mutáns analízissel kimutatták, hogy bHLH fehérje részt vesz az antocián bioszintézisben (Ramsay *et al.*, 2005) és szintén felelős a színek kialakulásáért (Chiu *et al.*, 2010).

A bHLH transzkripciós faktor módosulása megnövekedett piros pigment termelést okoz a kukorica aleuronjában. A bHLH expresszió csendesítés hatására, a rizs mag perikarpiumának színe pirosból fehérre alakul. Egy másik esetben, a bHLH szabályozó génben történő DNS transzpozon inszerció megváltoztatja a virág színt *Ipomoea*-ban, ami ezáltal halvány színű lesz (Chiu *et al.*, 2010).

3. WD40 fehérje (TTG1)

A WD40 fehérje egy rövid motívum, megközelítőleg 40 aminosavat tartalmaz, gyakran végződik triptofán-aszparaginsav dipeptid-kötésben. Több ilyen ismétlődés kombinációjából jön létre a fehérje domén, amit WD doménnek neveznek (internet 3). Közös funkciója minden WD40 ismétlődő egységnek, hogy megkönnyítik a fehérje-fehérje interakciót, és nincs belső enzimatis funkciójuk (Ramsay *et al.*, 2005). Az antocián bioszintézis szabályozásában részt vesz, és közvetlen kapcsolatban van a MYB fehérjével és a bHLH transzkripciós faktorokkal. (Chiu *et al.*, 2010). A TTG1 és a MYB transzkripciós faktorok együtt szabályoznak specifikus géneket az antocián bioszintézis során, fontos aktiváló komplexeket alkotnak, amelyek antocián strukturális gének expressziójában játszanak szerepet (Dugassa *et al.*, 2009).

A lila karfiolban *Pr* gén kódolja a BoMYB2-t (*Brassica oleracea MYB2 gén*), amely R2 és R3 MYB ismétlődő doméneket és motívumokat tartalmaz: KPRPR[S/T]F, specifikus MYB fehérje mely aktiválja az antocián bioszintézist (Chiu *et al.*, 2010).

A különböző fajokban eltérő lehet az antocián bioszintézis:

R2R3 MYB és bHLH transzkripciós faktorok reprezentálják a két legnagyobb családot az antocián szabályozó fehérjék között. *Arabidopsisban* a MYB transzkripciós faktor működéséhez szükséges a bHLH transzkripciós faktor az antocián szabályozáshoz, ezzel ellentétben, kukoricában külön-külön is aktiválják a transzkripciót. Petúniában ez a két fehérje család az antociánt szabályozó géneknek csak egy részét aktiválja (Yuan *et al.*, 2009).

Chiu és munkatársai (2010) a *Pr* gén funkciójának megerősítéséhez transzformációs vizsgálatokat végeztek. Vad típusú és mutációt hordozó növényekből genomi fragmentumokat juttattak be *Arabidopsis* és karfiol növénybe.

Transzgénikus *Arabidopsisban* a vad típusú *pr* allél saját promoter szabályozása alatt nem mutatott jelentős pigmentációt. Mutáns allél transzformációja szövet-specifikus antocián felhalmozódást okozott a növényekben. A pigmentek ebben az esetben is csak a fiatal növényi részekben halmozódtak fel.

Elvégezték ezt a kísérletet CaMV (karfiol mozaik vírus) 35S konstitutív promoter szabályozása alatt is. A vad típusú génnel és a mutáns génnel történő transzformáció is sötétlila transzgénikus *Arabidopsis* növényeket eredményezett, magas antocián tartalommal. Eredményeik alapján megállapították, hogy mindkét típusú gén kódol az antocián felhalmozáshoz szükséges funkcionális fehérjét (Chiu *et al.*, 2010).

2.5 Különböző mutációk összehasonlítása

A genetikai elemek áthelyeződése genetikai változások forrása lehet. A transzpozonok mutációkat okozhatnak a kódoló génekben is, így felerősödhet a működő gének kifejeződése, vagy megszűnhet működésük (Heszky *et al.*, 2008).

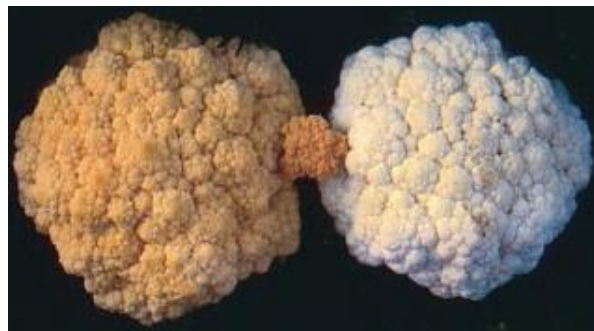
A szőlő (*Vitis vinifera*) fajták két csoportra oszthatók, attól függően, hogy jelen van-e, vagy hiányzik az antocián a bogyó héjából: kék és fehér szőlőre. Egy retrotranszpozon inszerció VvMYBA1 promoterben és egyéb mutációk előfordulása a szomszédos VvMYBA2 promoterben együttesen, az expresszió inaktiválásához vezetnek. A transzpozon beépülése a promoter működését gátolja, az

antocián bioszintézis út nem működik megfelelően. A transzpozon beépülésének eredménye, hogy a vörös szőlő bogyók helyett, fehér színű bogyók alakulnak ki (Walker *et al.*, 2007).

Ez a retrotranszpozon inszerció tökéletes példa a funkcióvesztéses mutáció - *loss of function* - bemutatására.

A lila karfiol esetében a *Harbinger DNS transzpozon* inszerció hatása szöges ellentétben áll a szőlő példájával. A beépült transzpozon miatt megnő a *Pr* gén expressziója. Az antocián struktúrgének túlszabályozása miatt intenzív lila színű karfiolrózsa alakul ki, melyben antocián halmozódik fel (Chiu *et al.*, 2010). Ebben az esetben funkciónyerésről van szó – *gain of function* - hiszen a karfiol antociánban gazdag lesz, és intenzív színeződést is kap.

A karfiol *Or* (orange) génjében történt *LTR retrotranszpozon* inszerció hatására a karfiolban megnő a karotin tartalom, emiatt a karfiol rózsája narancssárga lesz (Zhou *et al.*, 2008). A vad típusú karfiol esetében a rózsa fehér, vagy krémszínű. A heterozigóta karfiol rózsája normál méretűre fejlődik, de a narancssárga szín a fejekben kevésbé intenzíven jelenik meg. A homozigóta karfiolok esetében a rózsa színe intenzív narancssárga lesz, azonban a karfiol rózsa mérete jelentősen lecsökken (**8. ábra**). Ez a homozigóta narancssárga szín szorosan kapcsolt a törpe (dwarf) növekedéssel (Li *et al.*, 2001).



8. ábra: Narancssárga és fehér karfiol rózsák. Balról jobbra: heterozigóta narancssárga karfiol, homozigóta narancssárga karfiol, fehér karfiol. (Forrás: Li *et al.*, 2001)

A lila karfiolnál a transzpozon beépülése nem okoz a heterozigóta és homozigóta típusok esetében méretbeli különbséget. A heterozigóta és homozigóta egyedek vizuális megkülönböztetése azonban korántsem olyan egyszerű, mint a narancssárga karfiolok szín és méretbeli különbsége

alapján. Az intenzíven színeződő lila karfiol könnyen elkülöníthető a többi karfiol fajtától (sárga, zöld, fehér), de a heterozigóta és homozigóta formák elkülönítése néhány esetben nem lehetséges. A mély sötétlila karfiol biztosan homozigóta, de a világosabb lila egyedek között csak molekuláris marker segítségével tehető különbség. Valószínűleg más faktorok, vagy módosító gének is szerepet játszanak a rózsza végleges színének kialakításában.

2.6 *Harbinger* DNS transzpozon

A transzpozonok mozgékony genetikai elemek, melyek képesek áthelyeződni a DNS egyik pontjáról a másikra, géneket kapcsolnak ki és be, miközben egymás hatását gyengítik, vagy éppen felerősítik, és forrásul szolgálnak a különböző genetikai változásoknak (Gyulai *et al.*, 2010).

Harbinger DNS transzpozonokat azonosítottak már egysejtűekben, növényekben, rovarokban, férgekben, és gerincesekben, vagyis az egész élővilágban jelen vannak (Kapitonov *et al.*, 2004). A *Harbingerek* különböző fajokban általában két fehérjét kódolnak:

- szupercsalád-specifikus transzpozázt, és
- DNS-kötő fehérjét.

A *Harbinger* DNS transzpozon konzerválódott SANT/MYB/TRIHELIX motívummal jellemezhető. Az utolsó motívum fontos szerepet játszik a DNS kötés folyamatában, mely szükséges a *Harb* transzpozáz expresszió összehangolásához.

A lila karfiol esetében a mutációt *Harbinger* DNS transzpozon inszerció okozza, amely a BoMYB2 gén upstream szabályozó régiójába (-373 bp-nál) inszertálódott. A BoMYB2 gén szabályozza a *Brassica* genomok antocián bioszintézisét. A transzpozon inszerció felelős a *Pr* gén túlexpresszáldásáért, és az így indukált lila fenotípusos változásért a növényben.

A *Pr* gén aktiválódása feltehetőleg a transzpozonnal bekerült új szabályozó motívumok megjelenése miatt történik. A lila mutáns növény és a vad típus kódoló régióikban 99,2% az egyezés. A különbséget az okozza, hogy a mutációt hordozó lila karfiolban jelen van két plusz E-box szabályozó motívum, valamint egy extra TATA-box (Chiu *et al.*, 2010).

Karfiolból és káposztából származó BoMYB2 gén nukleotid szekvenciája 99,6%-ban azonos. Munkánk szempontjából nagy előrelépést jelentett az, hogy a fejes káposzta genomjának szekvenálása már befejezettnek tekinthető (Dr. Galli Zsolt, szóbeli közlés).

2.7 A PCR technika

A polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction) alkalmas DNS szakaszok *in vitro* felszaporítására, amplifikációjára. Mullis és Saiki dolgozta ki az eljárást 1985-ben. A PCR a sejtekben lejátszódó DNS replikációt utánozza, tulajdonképpen a DNS molekula enzimatis meg sokszorozását jelenti. A módszer lényege, hogy Taq-polimeráz (*Thermus aquaticus*) segítségével, rövid DNS szakaszok szintetizálódnak, ezek hosszát pedig a primerek határozzák meg. A keletkezett fragmentumok mérete a PCR után elektroforézissel meghatározható.

PCR lépései:

1. Denaturáció: DNS templát molekulát 90-94°C-on denaturáljuk.
2. Annealing (primer kapcsolódás): 36-72°C-on a két primer hibridizál a DNS két különböző szálával.
3. Polimerizáció: 72°C-on új DNS fragmentumok szintetizálódnak dNTP és Taq-polimeráz segítségével.
4. Ciklusok ismétlése 20-40 alkalommal.

A keletkezett fragmentumok minden ciklus alatt megkétszereződnek. A ciklusok során a fragmentumok száma exponenciálisan nő (Kiss, 1999).

2.8 Vörös káposzta

A vörös káposzta (*Brassica oleracea* var. *capitata*) vörös színeződése az antocián bioszintézis működésének, és a keletkezett színanyag felhalmozódásának köszönhető.

A fejes káposzta megfelelő termesztési körülmények között, a vörös káposztával ellentétben elhanyagolható mennyiségű vörös színanyagot tartalmaz.

A CHI enzim hasonló aktivitást mutat a vörös és fejes káposztában is, az antocián bioszintézisben résztvevő többi enzim (1. táblázat) azonban vörös káposztában nagyobb aktivitást mutat.

1. táblázat: Az antocián bioszintézisben részt vevő enzimek, és rövidítéseik. (Yuan *et al.*, 2009)

CHS	Chalcon szintáz
CHI	Chalcon izomeráz
F3H	Flavanon 3-hidroxiláz
F3'H	Flavonoid 3'-hidroxiláz
DFR	Dihidroflavonol reduktáz
LDOX	Antocianidin szintáz
GST	Glutation s-transzferáz

Az antocián felhalmozódás eltérő lehet a vörös káposzta növényen belül a különböző szövetekben, szervekben. A mag endospermiumában nincs antocián felhalmozódás egyik káposzta esetében sem. A vörös káposzta csak a vegetatív növekedés szakaszában halmoz fel antociánt, ilyenkor a bioszintézis út folyamatosan túl expresszált. A fiatal magoncok kezdetben sötétvörös színűek, főként a levélerek, a többi részen piros szín jön létre. A vörös káposzta szöveiteiben a felső és alsó epidermiszen megjelenik az antocián vörös színe, ezzel ellentétben, a fejes káposztában az epidermisz nem színeződik el.

A vörös káposztában és a lila karfiolban jelen lévő antociánok is rendelkeznek antioxidáns hatással. Vörös káposztánál a fejben mérték a legmagasabb értéket, ami 182mg/100g (Yuan *et al.*, 2009), mely hasonló az áfonyában mért értékekhez (Gao *et al.*, 1994). Fejes káposztában ez az érték mindösszesen 0,2 mg/100g (Yuan *et al.*, 2009). A vörös káposztában az antocián összetevők közül cianidin- 3- diglükozid- 5- glükóz a legnagyobb mennyiségben jelen levő antocián komponens.

A vörös káposzta normál körülmények között folyamatosan szintetizál antociánt, de tápanyag stresszre képes még többet szintetizálni. A tápanyag stresszre adott válasz anélkül növeli az antocián tartalmat, hogy annak fő összetevőinek aránya változna (Yuan *et al.*, 2009).

3. Anyag és módszer

3.1 *Növényanyag*

A lila karfiol levélmintákat a Syngenta Seeds Kft. Kísérleti Állomásról, Ócsáról kaptuk, Dr. Galli Zsolt növénynemesítőnek köszönhetően, aki káposztafélék nemesítésével foglalkozik. Magyarországon itt nemesítik a hagyományos fehér és a színes karfiol fajtákat a Syngentán belül. A levélminták mellett kaptunk még lila színű (heterozigóta genotípusú) karfiol magokat is, melyekből a csírázás után kifejlődött friss levélből izoláltunk DNS-t a kísérletekhez.

A kapott levélmintákat a DNS-izolálásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Többféle geno- és fenotípusú karfiol mintát használtunk a molekuláris elemzéshez:

- Hagyományos fehér karfiolt, amely boltból származik;
- Lila karfiol levélmintákat: 10-1158-1, 10-1221-2, 08G0210-2, 09G0171-1, 09G0172-2, 09R0142-1, 10-1641-1, 09G0205-1 nemesítési kóddal jelöltek, amelyeknek genotípusa ismeretlen;
- 09G0180-1 számú lila karfiol vonalat, amely homozigóta lila genotípusú;
- A C8400-as jelzésű heterozigóta lila karfiol hibrid – amelynek a 09G0180-1 kódszámú lila karfiol a beporzó szülője – magmintákat kaptunk az ócsai nemesítő állomásról;
- Narancssárga karfiolt;
- Zöld karfiolt;
- Csúcsos karfiolt (Romanesco).

3.2 *DNS izolálás*

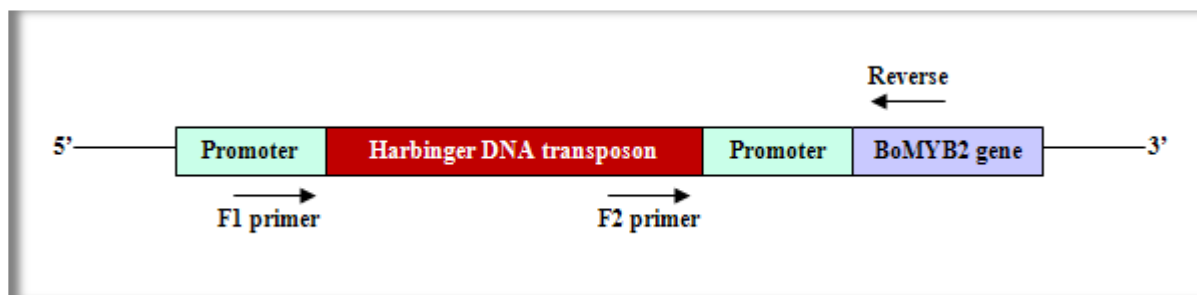
A DNS izolálásához mintánként 100 mg fiatal levelet használtunk fel. A leveleket dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel elporítottuk, majd DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) alkalmazásával a DNS-t kivontuk és tisztítottuk (Qiagen, 2003). A DNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel mértük, majd a törzsoldatokból 10 ng/ μl koncentrációjú hígításokat készítettünk, amelyeket templátként használtunk fel a PCR reakciók során.

3.3 Tervezett primerek

A *Pr* karfiol gén nukleotid szekvenciákra és a beépült transzpozon szekvenciákra primereket terveztünk (Gén Banki azonosító száma: **GU219986**) (**11. ábra**).

Két primer szettet terveztünk (**9. és 10. ábra**), amelyeknek az alkalmazhatóságát a későbbiekben teszteltünk.

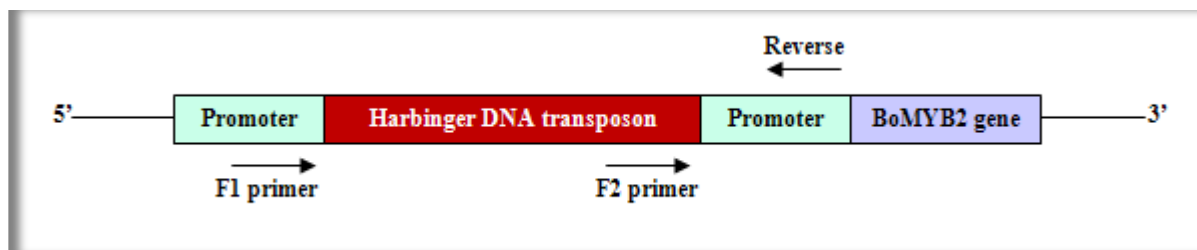
Első primer szett:



9. ábra: Primerek kapcsolódási helye és a beépült a transzpozon inszerciót tartalmazó *BoMYB2* gén sematikus ábrája.

Forward 1 (vad típus): 5'- **GTCCGGAAGCCTCTGGTGCG** -3'
Forward 2 (transzpozon specifikus): 5'- **ACCCGTGACATTACAACCCGTGA** -3'
Reverse (gén specifikus): 5'- **ACTTGGTGCCATTTCCTTCTCCA** -3'

Második primer szett:



10. ábra: Primerek kapcsolódási helye és a beépült a transzpozon inszerciót tartalmazó *BoMYB2* gén sematikus ábrája.

Forward 1 (vad típus): 5'- **GCCTCTGGTGCGTGAAGTTGCT** -3'
Forward 2 (transzpozon specifikus): 5'- **ACCCGTGACAGAAGAATGCTCCA** -3'
Reverse (promoter specifikus): 5'- **CGGGCAAAGGGGAATGACGTGC** -3'

Az alábbi genomi szekvencia (**11. ábra**) tartalmazza a transzpozon, a *BoMYB2* gén promoter régiójának, valamint magának a génnek a dolgozat szempontjából fontos részleteit. A különböző részek más-más színekkel vannak jelölve: a promoter régiója fekete; az **exon1** félkövér és aláhúzott; az **intron1** kék színű; a **transzpozon** szekvenciája piros; a tervezett primerek tapadási helye **zölddel** (2. primer szett) van jelölve:

```
CTGTGTGGAGCAACTGAGCCATGGTTTTTCCAGATGTTGATGCTGGTGTGCTATTGCCTACTTCCCAGCCTGCAGAGTTGATTATGATATCG
CGACCAATTAGAATCTCCCTCCATCCATGAGAGATTCCGTTTTCTCTGAGCATTCTAAGAACTTTTCGGAGTTGCAATACTTCCCAAACAG
GACTCGGCCAAGTAGGGAGTCGGGACGATTGATGAGCCTCCAACCTTAGTTTTGCAAGGAACGCTTCATTAAACTCTGAATGTCTCTGAAGT
TTAAACCTCCACTTTTCCTTGGGTTGCACCAGCTTAGACCAAGCAATCCATGCCATCTTCTGTCTCCACGTTCTGTGTCCACAGAGCG
TGTTAACGCTGATTGAATCTCTTACATAGAGATATCGGAAGTTGGAACAAGATATAGCGTGTGACGGAATGGGGGATAACACACTTGTGA
GCATAGTCATCTTCCCGGCTGTGCGATAAGAAACGGTTTTGACCACCCGCAGGCCTTTGCTTTATGCGGTCCACTAATGATGAGAATAAGTCT
CTCTTTTTCTTCCGAACAGCTCTGGAAGCCCGGATATTTCCGATACCTCCCTCTTTCTGGATCGAGAGAGCGTCTTTGACATCCGTTT
TAGAGCTATCGGGGCGTGTCTAGAGAAATTGATCGAGGATTTTTAGTGTTGATTGACTGTCCGGAAGSCCTCTGGTGCGTGAAGTTGCTCC
CTCTTTTAGTGATATAAACCATCTTCCAC
```

```
...
ATCATTTAATGTACCTGGAGGTCCAAAAATGCATGCCATATCCAGAGATCATATGAAGCAACCGCTCTAAAACGATTGTTGGCTTACCC
GAACCACGACAATATTGCCCTTTCCAAGCGGTGGGAAATCTTCCACTCCCAATGCATACAATCGATGCTTCCTATCATCCCGGAAATCC
ACGATGCTCTCCAACATAAAGTAGACGTTGAAGATCAGCTGGTGTGGTCTTCTTAGGTATTCATCACCGAAAAATCAATTATTCCTTCCA
CAAAATTCCTCAAACATGACCGAGCTGTAGTTTCACTGAGCCGGAGATATTCGTTGACCGTATCAGCCGATTACCATATGCCAAGAGACG
AATAGCAGCTGTACACTTTGGAGTGCTGAGAGACCAAGCTTGCCAAGACCATCTGGCTTTTGGTGAAAGAAGTCAACTTCGTTGGAGAGTC
GATAAACAAATGCGCATGAACAATGGCTTGTTCATTTCGAAAACGTTGTGCGAAAAATTTTCAGGATACGTTGGAGTCTCACTGAAATAATCA
TTCCATAAACGTACATTGTCTGCTTCACGATTTCTTTTCGATATAAGCTCGTTTTTTTTCTTTTTCTTCTCGTTCTTCTTGATCACCATAA
TGGTTAATTTCTCAAAGGTTTGACCAAAACATCTCTCAAAGGCTTGATCAAACATTCCTCAAATTCATCATCTAGAGTGTTTTGAGAAGA
AGAAGCCATATATGGTGATTGAAAAGAAAAGATGGTAAAGAATGAACTTTGGGGTTTTATAATCAAGAGGGGTTGTGGGTGTTTTTTTTAA
ATTCAAGAGTGAGGTTGTGCGAAGTGTTTAAAGAGAGAACATGATGTTTAAAAAGAGAGATTATTGTTATTTAGAAGAAAGAACTTGAGA
CTAAAGAGAGAACTTGAGAATGTCTTGCTTTGATCTTTGGTTTCGGTGAACTATGAGGAGAGAAAAATGAATTGGTACTCTGGAAGACAGA
AGCATGAATACTTTAAATGTTTGATGATACAAGTCTCGTGAAACCAAATAATAATACAAGTCACATGCATACAACGAGACTCTAGGTCCG
TGATAGAAAATAACAAAAGTACAATAGCAGAGAGAAACAAAAGTACAACCCGTACATTACAACCCGTGAGAAGCACAAACATTATAGCATACA
AACAGGAGACAAGAGTACAAGCACAAATACAACCGTGACGAGAAGATGCTCCATTTCATTACCTGACAACAAAAGAAGATACAGAAATTA
GAAACATATATATTAAACAGAACTTATGCAACAAGATAAACTACATAACTTATGCAATAGAAACCACTTACACTAATTAGACATTAACCTC
ATCAATGAGTTTCTTCTTCAAACCTTCTTCATAGCCGCAAGAGGTTTCGGGTTTAGCAATGAGACTGTCCATTCAATCATTAATAGTACTTT
CTCTCCTAATTGTTAGGAGACATGTTTTTCTTTAAAGTCTCGAAAAAGATGAAGATACTAGGTGCTAGAACCTTTTCTCTATTTAGTCTA
AATTTTTTTTTGTGCGCTATTTAGTCTAAATCAGTAGCAGAACATAAATAACGAAATTAGCAAATTAACACGACAACAAAACATTAAATG
TGGATGTTAGACAGCACGTCAATCCCTTTGCCCCGTCACTTGTATAAATAAAGTCTCGAAGGATTTGTCAAGCCACAATATAAACCCCTT
TCCTCAAGCCTTTACCTATATATATATATAAATTTATAAACTTTGGTAGATACTTATATTATATATCGCTGGTCCATGGAGGGTATGT
CCAAAGGGTTGAAAAAGGTGCATGGACTGCTGAAGAAGATAATCTCTTGAGGCAATGCATTGATAAGTATGGAGAAGGGAAATGCACCAA
GTTCTTTAAGAGCTGGTATGTCTTTTTTTTTTGATAAAATAAGAGCTGGTATGCTACTTTTATTAATTTTCACACACAGACACACACAC
ACACACACATATATACATATACATATAACTATAAGTACGTATATTCTTTTTATTTTTTCACTACATTTATTCTCTTTCTC...
```

11. ábra: A *Pr* gén és a transzpozon genomi szekvencia részlete, amelyre a primereket terveztük (Chiu *et al*, 2010).

A tervezett primer szettek alkalmazása:

Első primer szett:

A PCR során mindhárom markert egyszerre alkalmazzuk. A fehér és más színű (narancs, zöld) karfiolokban csak az F1+R primerekkel kapunk egy 546 bp hosszúságú terméket.

Az erre a mutációra nézve homozigóta lila karfiolokban egy 783 bp méretű terméket kapunk (F2+R). A *Harbinger transzpozon* pontos mérete nem ismert, mivel nincs meg a teljes szekvenciája. *Arabidopsis*-ban több mint 5300 bp hosszúságú, ezáltal feltételezhetjük, hogy egy normál PCR reakcióban nem kapunk terméket a homozigóta mutáns (lila) karfiolban az F1+R primereket alkalmazva. A heterozigótákban meg kell kapnunk mindkét terméket (F1+R; F2+R).

Második primer szett:

Az eltérés az előző szetthez képest az, hogy a gén-specifikus reverse primert átcsúsztottuk a promoterbe, de a forward primerek esetében is új pozíciókat kerestünk.

A PCR során itt is mindhárom markert egyszerre alkalmazzuk. A fehér karfiolokban csak az F1+R primerekkel kapunk egy 292 bp hosszúságú terméket. Az erre a mutációra nézve homozigóta lila karfiolokban egy 464 bp méretű terméket kell kapnunk (F2+R), míg a heterozigótákban meg kell kapnunk mindkét terméket (F1+R; F2+R). A homozigóta mutáns karfiol mintákban szintén nem várunk terméket az F1+R primerekkel a transzpozon nagy méretének köszönhetően.

3.4 PCR körülmények

A PCR-t Biorad iCycler készülékkel végeztük, 10µl végtérfogatban.

A PCR-hez alkalmazott mastermix összetevői:

- | | |
|-------------------------------|------------------------------|
| - 0,5 µl MgCl ₂ | - 0,75 µl reverse primer (R) |
| - 1,25 µl puffer | - 0,15 µl dNTP |
| - 0,75 µl forward primer (F1) | - 0,6 µl Taq-polymerase |
| - 0,75 µl forward primer (F2) | - 4 µl steril víz |

A primer kombinációk tesztelése során a következő reakció körülményeket alkalmaztuk:

57°C-os PCR:

1. 2 perces 94 °C-os előciklus
 2. Denaturálás 94 °C-on 10 mp-ig
 3. Primerkapcsolódás 57 °C-on 30 mp-ig
 4. DNS-szintézis 72 °C-on 1 percig – 40 ciklus
- Majd 5 perces 72 °C-on történő utópolimerizáció.

65°C-os 'touch down' PCR:

1. 2 perces 94 °C-os előciklus ('hot start'),
 2. 10 cikluson keresztül: 94°C-on 30 mp-ig - denaturálás
65°C-on 30 mp-ig - primerkapcsolódás
72°C-on 1 percig - DNS-szintézis.
- A kapcsolódási hőmérséklet ciklusonként 1°C-kal csökken.
3. 24 cikluson keresztül: 94°C-on 30 mp-ig
56°C-on 30 mp-ig
72°C-on 1 percig;
majd 5 perces 72°C-on történő utópolimerizáció.

A mintákat etídium-bromiddal festett agaróz gélen futattuk meg, 80 V feszültségen, a futási idő 25-30 perc volt. Futás után a mintázatokat 313 nm-es UV fényben digitális kamerával fényképeztük és detektáltuk.

4. Eredmények és megvitatásuk

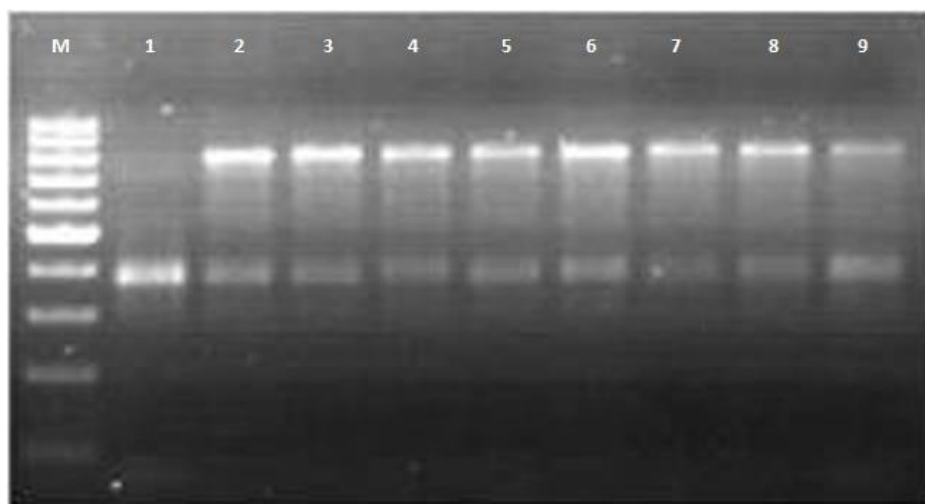
4.1 Molekuláris markerek tervezése és alkalmazása

Célunk olyan molekuláris marker fejlesztése volt, amellyel könnyedén el tudjuk különíteni a lila fenotípusú karfiolokat a többi színűtől (fehér, narancssárga, zöld), valamint a lila fenotípusú egyedek között szét tudjuk válogatni a homozigóta és heterozigóta genotípusokat. Ehhez a rendelkezésre álló szekvenciák alapján primereket terveztünk. A gén teljes szekvenciáját és a transzpozon részszekvenciáit már publikálták (Chiu *et al*, 2010).

Köszönhetően a mutáció által kiváltott intenzív lila színű karfiolrózsa színeződésnek, fenotípusosan könnyen megkülönböztethető a lila mutációt hordozó karfiol a többi karfioltól, mint például a külföldön nagy népszerűségnek örvendő narancssárga karfiol, zöld karfiol, csúcsos karfiol, vagy akár a hagyományos, hazánkban is kedvelt fehér karfiol. Olyan kodomináns markereket terveztünk, amelyek lehetővé teszik a karfiol *Pr* gén mutációja meglétének (homozigóta és heterozigóta), valamint hiányának detektálását a növény fejlettségi állapotától függetlenül.

Első lépésben az első tervezett primer szettet teszteltük, a PCR során 57°C-os primer kapcsolódási (annealing) hőmérsékletet alkalmazva. A **12. ábrán** látható, hogy a fehér fenotípus elkülöníthető a lila fenotípusoktól.

Mivel a *Harbinger* transzpozon pontos mérete jelenleg még nem ismert a karfiolban, de az *Arabidopsis*-ban több mint 5300 bp hosszúságú; ezért feltételezhetjük, hogy egy normál PCR reakció során nem kapunk terméket a homozigóta mutáns (lila) karfiolban az F1+R primereket alkalmazva. Tehát így kimutatható a lila fenotípustól eltérő színű karfiol (fehér, narancs, zöld), amely nem hordozza az általunk keresett mutációt. Az F1 (forward) primer gén specifikus, az F2 primer transzpozon specifikus, így a reakció során a *Myb2* gén specifikus reverz primerrel (**8. ábra**) az F2+R primer kombináció csak a mutációt tartalmazó lila karfiolban szaporít fel terméket, a primerpár domináns markerként működik. A három primert együttesen alkalmazva (F1+F2+R), a primer szett kodomináns markerként alkalmazható, lehetővé válik nemcsak az eltérő fenotípusok (lila, más színű), hanem a lila színűeken belül a heterozigóta és a homozigóta genotípusok elkülönítése is.



12. ábra: Az első primer szettel végzett PCR eredménye.

M: molekula tömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1: fehér karfiol, 2-9: lila karfiolok (10-1158-1, 10-1221-2, 08G0210-2, 09G0171-1, 09G0172-2, 09R0142-1, 10-1641-1, 09G0205-1), genotípusukat nem ismertük.

Az első primer szett alkalmazása során mindhárom markert egyszerre alkalmazva azt vártuk, hogy a fehér karfiolban egy 546 bp méretű fragmentum, a homozigóta lila karfiolban egy 783 bp méretű és a heterozigóta lila karfiolban mindkettő méretű fragmentumot megkapjuk. A **12. ábrán** látható, hogy a lila karfiolokban felszaporodott a várt 783 bp méretű fragmentum (a minták genotípusát nem ismertük), de a fehér karfiolban egy nem specifikus terméket kaptunk, illetve ez a termék a lila mintákban is megjelent.

A nem specifikus fragmentumok felszaporodása miatt egy második primer szettet is terveztünk. Az eltérés az első primer szetthez képest, hogy a génspecifikus R (reverz) primer el lett csúsztatva a promóter irányába, és a forward primerek esetében is új helyeket, pozíciókat kerestünk. Az elgondolás itt is ugyanaz volt: az F1 (forward) és R (reverse) primer együtt egy 292 bp méretű fragmentumot szaporít fel, amellyel a *Harbinger transzpozon* okozta mutációt nem tartalmazó karfiolok detektálhatók. Az F2 és a R primer használatával egy 464 bp méretű PCR terméket várunk, amely csak a lila fenotípusú, mutációt hordozó karfiolok esetében szaporodik fel. A három primert együttesen alkalmazva, a mutációt nem hordozó karfiolokban felszaporodik a 292 bp méretű fragmentum, a homozigóta lila karfiolokban a 464 bp méretű, és a heterozigóta karfiolokban megkapjuk mindkét terméket.

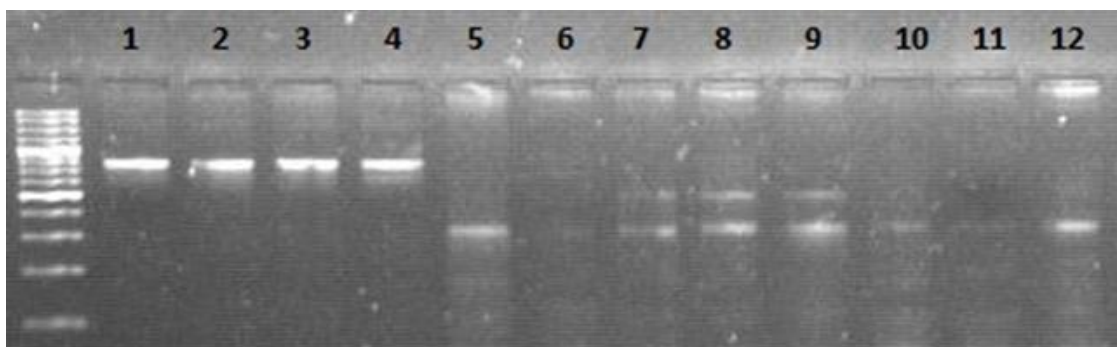
Mivel az előző primerek tesztelésénél olyan lila karfiol mintákat vizsgáltunk, amelyeknek nem tudtuk a genotípusát, bevontunk a vizsgálatokba biztosan homozigóta lila fix vonalat (09G0180-1

kóddal jelölt), illetve ennek fehér karfiollal keresztezéssel kialakított, biztosan heterozigóta hibridjét is. A hibridet mag formájában kaptuk meg, amelyeket csíráztattunk, és az első lomblevelekből DNS-t izoláltunk. Ezek a minták biztosan heterozigóták a mutációra nézve, a hibrid nemesítési kódja: C8400.

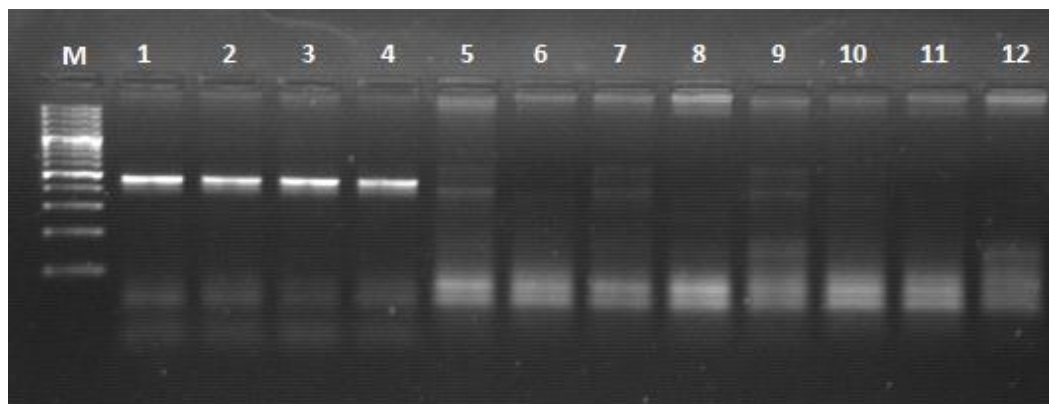
További eltérés volt még, hogy a PCR során 65°C-os 'touch down' programot alkalmaztunk, a nem specifikus kötődések elkerülése érdekében. A 'touch down' program elve, hogy a primerek olvadási hőmérsékleténél (T_m) magasabb hőmérsékleten indítjuk a reakciót, majd ciklusonként 1°C-kal csökkentjük az annealing hőmérsékletét. Ezzel a módszerrel a primerek tapadásának specifikusságát növelhetjük.

4.2 Lila fenotípus elkülönítése

Abban az esetben, ha egy reakcióban nem alkalmazzuk mindhárom primert (F1+F2+R), hanem csak a transzpozon specifikus F2 forward primert és a reverse primert (F2+R), a marker domináns markerként működik. Lehetővé teszi a lila karfiolok elkülönítését a többi fenotípustól, hiszen a reakció során kizárólag a lila fenotípust okozó mutációt hordozó egyedekben szaporítja fel a specifikus fragmentumot (13. és 14. ábra).



13. ábra: Az első primer szettal (F2+R) végzett PCR eredménye további karfiol mintákkal. M: molekula tömeg marker (GeneRuler 100 bp Plus Ladder) 1: 090180G-1 – homozigóta lila karfiol 2-4: C8400 – heterozigóta lila karfiol 5: zöld karfiol, 6: csúcsos karfiol, 7-9: narancsszínű karfiol, 10-12: fehér színű karfiolok.



14. ábra: A második primer szettal (F2+R) végzett PCR eredménye további karfiol mintákkal. M: molekula tömeg marker (GeneRuler 100 bp Plus Ladder) 1: 090180G-1 – homozigóta lila karfiol 2-4: C8400 – heterozigóta lila karfiol 5: zöld karfiol, 6: csúcsos karfiol, 7-9: narancs színű karfiol, 10-12: fehér színű karfiolok.

A reakcióban használt két primer (F2 + R) a mutációt hordozó lila karfiol homozigóta és heterozigóta genotípusai között nem tud különbséget tenni, mindkét esetben csak egy terméket kapunk.

A lilától eltérő színű karfiolokban nem kapunk terméket, hiszen ebben az esetben a lila fenotípust okozó mutáció nincs jelen. Az eredmények szerint mindkét primer szett alkalmas arra, hogy a lila karfiolban jelen lévő mutációt kimutassák, illetve elkülönítsék a lila fenotípust a többi fenotípustól.

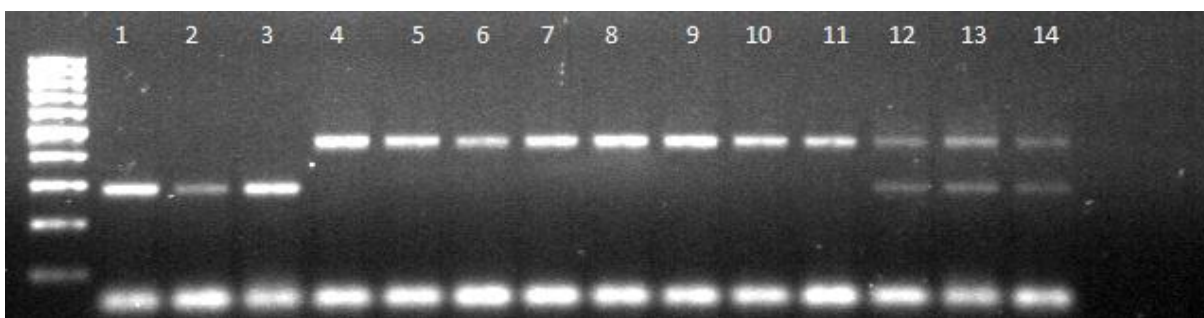
4.3 *Lila genotípusok elkülönítése*

A nemesítők számára a lila mutációt hordozó karfiol egyedek között a heterozigóta és homozigóta egyedek elkülönítése nem mindig könnyű feladat. A sötétlila rózsával rendelkező növényről nagy valószínűséggel megállapítható, hogy az homozigóta, de a világosabb lila fejek is lehetnek homozigóták a rózsza színeződésétől függetlenül (**15. ábra**). A tervezett 3 primer együttes alkalmazásával (F1+F2+R), kodomináns markert kapunk, lehetővé válik a lila fenotípuson belül a heterozigóta és a homozigóta genotípusú egyedek elkülönítése is.



15. ábra: A mutációt hordozó lila karfiolok rózsáinak színeződését, és a lila szín intenzitásának nagyfokú változatosságát szemléltető ábra. (Készítette Dr. Galli Zsolt)

A különböző egyedeknél kialakult eltérő intenzitású lila színeződés nem enged következtetni az egyed genotípusára. A nemesítési munka során azonban szükség van arra, hogy a keresztezéshez kiválasztott szülőről biztosan meg tudjuk mondani, hogy homozigóta vagy heterozigóta formában hordozza-e a mutációt az adott egyed. A kifejlesztett kodomináns markerekkel végzett PCR során könnyen elkülöníthetjük a heterozigóta és homozigóta egyedeket (**16. ábra**).

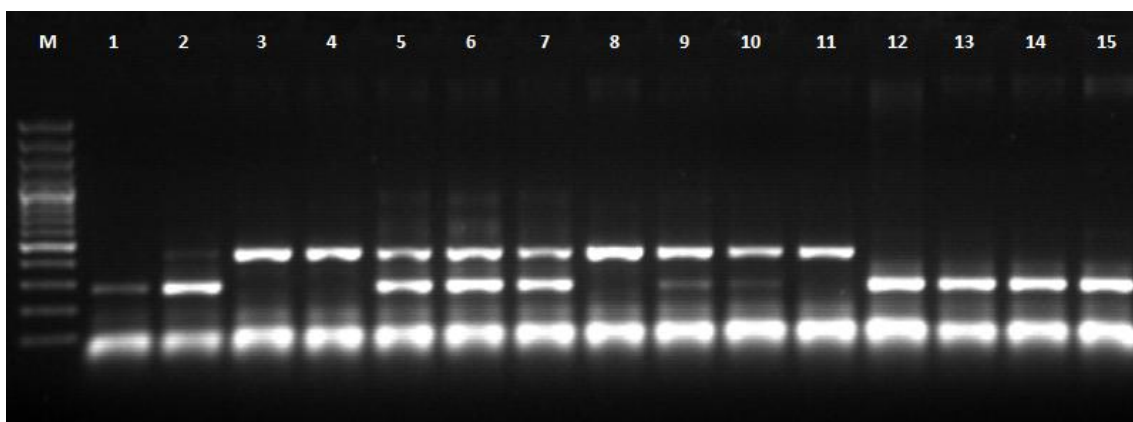


16. ábra: A második primer szettel végzett PCR eredménye.

M: molekula tömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1-3: fehér karfiol, 4-11: lila karfiolok (10-1158-1, 10-1221-2, 08G0210-2, 09G0171-1, 09G0172-2, 09R0142-1, 10-1641-1, 09G0205-1), genotípusukat nem ismertük; 12-14: heterozigóta lila karfiol (C8400)

A második primer szettel is elvégeztük a PCR-t, ezúttal mindhárom primert alkalmazva (F1+F2+R), amelynek eredménye a **16. ábrán** látható. A fehér karfiol esetében felszaporodott a várt 292 bp méretű fragmentum, a heterozigóta lila genotípusnál (C8400) megkaptuk mindkét fragmentumot (292 bp és 464 bp), míg a homozigóta lila genotípus esetén csak a transzpozon specifikus forward primer tudott működni, így csak a 464 bp méretű termék szaporodott fel. Tehát a második primer szett specifikusan működött, ahogy vártuk. Ezzel lehetőség nyílt a különböző fenotípusú karfiolok, a mutációt hordozó, illetve nem tartalmazó genotípusok elkülönítésére, valamint a lila karfiolokon belül a homozigóta és a heterozigóta genotípusok szétválogatására. Megállapítható, hogy az a 8 lila minta, amelyeknek nem tudtuk a genotípusát mind homozigóta a mutációra nézve (10-1158-1, 10-1221-2, 08G0210-2, 09G0171-1, 09G0172-2, 09R0142-1, 10-1641-1, 09G0205-1). Ez az információ segítséget nyújt a nemesítőnek a további keresztezési és nemesítési munka folyamatában.

A rózsza végleges színének kialakításában a transzkripciós faktor promoterébe történt inszerción kívül feltételezhetően még más módosító faktorok is szerepet játszhatnak. A kodomináns molekuláris markerek ilyen esetekben hasznosak lehetnek megkönnyítve a nemesítők szelekciós munkáját, akik így könnyedén juthatnak megbízható eredményekhez.



17. ábra: A második primer szettel (F1+F2+R) végzett PCR eredménye lila és más színű karfiolokkal. M: molekula tömeg marker (GeneRuler 100 bp Ladder) 1-2: fehér karfiol, 3-4: homozigóta lila karfiol (09G0180-1) 5-7: heterozigóta lila karfiol (C8400) 8-11: lila karfiolok (10-1158-1, 10-1221-2, 08G0210-2, 09G0171-1) 12: zöld karfiol 13: csúcsos karfiol 14-15: sárga karfiol

Kiterjesztve a vizsgálatokat, mindhárom primer alkalmazásával további színes karfiol mintákat is teszteltünk (**17. ábra**). Az ábrán jól látható, hogy a *Harbinger transzpozon* mutációt nem hordozó fehér, zöld, sárga színű, valamint a csúcsos karfiolban csak a 292 bp méretű fragmentum szaporodott fel, a lila színűekben pedig attól függően, hogy homozigóták-e vagy heterozigóták, felszaporodott a 464 bp méretű, illetve mindkét specifikus fragmentum. A marker tehát alkalmas a különböző fenotípusú (lila és más színű), valamint a különböző lila genotípusok, heterozigóta vagy homozigóta elkülönítésére.

A kodomináns marker alkalmazható a karfiolnemesítés során, könnyebbé téve a szelekciót, segít megkülönböztetni az egyes allélformákat és objektív adatokkal megerősíti a fenotípusos megfigyeléseket.

Nagy jelentőségű az antociánban gazdag zöltségek, gyümölcsök nemesítése, előállítás, mivel a bennük rejlő antioxidáns kapacitásuknak köszönhetően egészségmegőrző hatásuk van. Fogyasztásukkal csökkenthető bizonyos betegségek pl. szív- és érrendszeri megbetegedések, a rák bizonyos formái, és egyéb krónikus betegségek kialakulásának kockázata (Hou, 2003).

Jövőbeni terveink között szerepel a vörös káposzta molekuláris vizsgálata is. Jó okunk van feltételezni, hogy a káposzta esetében is a *Myb2* génben, vagy annak promóter régiójában bekövetkezett mutáció okozza az antocián felhalmozódást a lila káposztában. Ennek bizonyítására első lépésben primereket tervezünk a *Myb2* gén és az azt határoló szekvenciákra, hossz-polimorfizmust keresve a fejes káposzta és a vörös káposzta között. A szekvencia információkat ennek a vizsgálatnak az elvégzéséhez a Syngenta cég biztosítja számunkra. Mivel a genomi szekvencia csak a fejes káposzta

esetében áll rendelkezésre, azt várjuk, hogy a fejes káposzta mintáinkban megkapjuk majd a pontos méreteket, de a lila káposztában valamelyik termékben eltérést kell kapnunk, ha a teóriánk helyes. Könnyen elképzelhető, hogy egy esetben a termék hiánya transzpozon inszerciót jelez majd, amivel reményeink szerint elindulhatunk majd az antocián felhalmozódás molekuláris feltérképezésének irányába a lila káposzta esetében is. Nem lennénk meglepve, ha a lila karfiolhoz hasonló magyarázatot találnánk erre a kérdésre is.

5. Értékelés és következtetések

Célunk olyan kodomináns molekuláris marker kifejlesztése és alkalmazása volt, amely jól alkalmazható az eltérő lila karfiol genotípusok molekuláris elkülönítésére. Ebből a célból két primer szettet terveztünk, amelyeknek az alkalmazhatóságát a későbbiekben PCR, és gélelektroforézis segítségével teszteltük.

A nemesítők számára a lila mutáns karfiolok között a heterozigóta és homozigóta egyedek fenotípusos elkülönítése nem minden esetben egyértelmű, mert a különböző egyedeknél kialakult eltérő intenzitású lila színeződés nem enged kizárólagos hatállyal következtetni az egyed genotípusára.

Olyan kodomináns markereket sikerült terveztünk, amelyek lehetővé teszik a karfiol *Pr* génben történt mutáció meglétét, valamint hiányát detektálni a növényeknél már korai fenológiai fázisban. A tervezett három primert együttesen alkalmazva (F1+F2+R), a primer szett kodomináns markerként alkalmazható, lehetővé válik nemcsak az eltérő fenotípusok (lila, más színű), hanem a lila színűeken belül a heterozigóta és a homozigóta genotípusok elkülönítése is, mindez egy PCR reakcióban.

Eredményünk azért is fontos, mert a karfiolrózsa végleges színének kialakításában a transzkripciós faktor promoterébe történt inszerción kívül feltételezhetően még más módosító faktorok is szerepet játszhatnak. A kodomináns molekuláris markerek ilyen esetekben különösen hasznosak lehetnek, megkönnyítve a nemesítők szelekciós munkáját, akik egyszerű genetikai vizsgálatokkal könnyedén juthatnak megbízható eredményekhez.

A kapott eredmények szerint mindkét tervezett primer szett alkalmas arra, hogy a mutációt hordozó lila karfiolban jelen lévő mutációt detektálják, illetve elkülönítsék a lila fenotípust a többi fenotípustól. A kodomináns marker alkalmazható a karfiolnemesítés során, könnyebbé téve a szelekciót, segít megkülönböztetni az egyes allélformákat és objektív adatokkal megerősíti a fenotípusos megfigyeléseket.

6. Összefoglalás

A lila gén (*Pr*) mutációja karfiolban abnormális, szövet-specifikus antocián felhalmozódást okoz, melynek eredménye a lila mutáns fenotípus. A nagy mennyiségű antocián termelésért egy transzpozon inszerció által kiváltott mutáció a felelős. A mutációt *Harbinger DNS transzpozon* okozza, amely a *Pr* gén upstream szabályozó szakaszába épül be. Az intenzív karfiolrózsa színeződésnek köszönhetően a lila karfiol mutáns egyedek szemmel könnyedén elkülöníthetők a többi karfiol fajtától, azonban a heterozigóta és homozigóta egyedek között nem lehet különbséget tenni.

TDK dolgozatunk célja olyan kodomináns molekuláris marker fejlesztése és alkalmazása, amely jól alkalmazható a különböző lila karfiol egyedek genotípusának elkülönítésére.

Két primer szettet terveztünk, amelyek alkalmazhatóságát a későbbiekben polimeráz láncreakciók alkalmazásával teszteltük.

Vizsgálataink során az első primer szett alkalmazásával nem specifikus fragmentum is megjelentek, ami nem tette számunkra egyértelművé a kapott eredményeket. Ezért változtattunk a PCR körülményeken, és a primerek tapadási helyét is elcsúsztattuk. A második primer szett specifikusabban kötődik az előzőnél, és pontosabb eredmények kaptunk használatával.

Molekuláris vizsgálataink során PCR technikát alkalmaztunk, mert ez a legegyszerűbb módja a mutációk detektálásának. A molekuláris markerezés gyors és olcsó módszer, az eredmények megbízhatóak és ismételhetőek.

A kodomináns molekuláris markerekkel egy reakcióban el tudtuk különíteni a különböző színű karfiolokat, valamint a lila karfiol heterozigóta és homozigóta formáit is. Vizsgálatainkat többször megismételtük, a második primer szett tökéletesen alkalmas a kitűzött célok eléréséhez.

7. Irodalomjegyzék

1. ACCIARRI, N., SABATINI, E., ROTINO, G.L., CIRIACI, T., PULCINI, L., DELLA CAMPA M., MAESTRELLI, A. (2008): 5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 16 th Crucifer Genetics Workshop. Breeding in Progress in New Typologies of Orange Cauliflowers. Breeding In Progress In New Typologies Of Orange Cauliflowers. Poster, Brassica2008-Lillehammer-Norway
2. ALLAN C. A., R. P. HELLENS, W. A. LAING (2008): MYB transcription factors that colour our fruit. Trends in Plant Science Vol.13 No.3
3. Broun, P. (2005): Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in Arabidopsis. Elsevier, Plant Biology 2005, 8:272-279
4. CASTANEDA-OVANDO, A., MA DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, MA ELENA PÁEZ-HERNÁNDEZ, JOSÉ A. RODRÍGUEZ, CARLOS ANDRÉS GALÁN-VIDAL (2008): Chemical Studies Of Anthocyanins: Review. Elsevier, Food Chemistry 113 (2009) 859-871.
5. CHIU, L. (2006): Molecular Characterization Of A Purple Cauliflower Mutant That Induces High-Level Of Anthocyanin Accumulation. Poster: Secondary metabolism.
6. CHIU, L., XIANGJUN ZHOU, SARAH BURKE, XIANLI WU, RONALD L. PRIOR AND LI LI (2010): The Purple Cauliflower Arises From Activation Of A Myb Transcription Factor. Plant Physiology, November 2010, Vol. 154, Pp. 1470-1480.
7. CRISP, P., WALKER, D.G.A, BELLMAN, E., ROBERTS, E. (1974): A Mutation Affecting Curd Colour In Cauliflower (*Brassica Oleracea* L. Var. *Botrytis* Dc). Euphytica 24 (1975) 173-176.
8. DUGASSA N. FEYISSA, TROND LOVDAL, KRISTINE M. OLSEN, RUNE SLIMESTAD, CATHRINE LILLO (2006): The Endogenous Gl3, But Not Egl3, Gene Is Necessary For Anthocyanin Accumulation As Induced By Nitrogen Depletion In Arabidopsis Rosette Stage Leaves. Springer-Verlag 2009.
9. GAO L., MAZZA G., (1994): Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. J Food Sci 59:1057-1059.
10. GROTEWOLD, E. (2006): The Science Of Flavonoids. The Ohio State University, Columbus, Ohio, Usa. 2006 Springer Science+Business Media Inc.
11. GYULAI G (2010): Természettudományi Genetika. Egyetemi jegyzet. pp. 210. SzIE MKK KTI, Gödöllő.

12. HEIM, MARC A., JACOBY, M., WERBER, M., MARTIN C., WEISSHAR B., BAILEY, P. C. (2003): The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family In Plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity- *Mol. Biol. Evol.* 20(5):735-747. 2003
13. HESZKY L., FÉSÜS L., HORNOK L. (2005): *Mezőgazdasági Biotechnológia*. Agroinform, Budapest
14. HESZKY L., GALLI ZS. (2008): *A Genetika Alapjai*. Szent István Egyetemi Kiadó. Gödöllő.
15. HOLTON, T. A., CORNISH, E. C. (1995): Genetics And Biochemistry Of Anthocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell*, Vol. 7, 1071-1083, July 1995.
16. HOU DX. (2003): Potential Mechanism Of Cancer Chemoprevention By Anthocyanins. *Curr Mol Med* 3:149-159.
17. KAPITONOV, V. V., JURKA, J. (2004): Harbinger Transposons and an Ancient HARBI1 Gene Derived from a Transposase. *DNA AND CELL BIOLOGY* Volume 23, Number 5, 2004. Pp. 311-324.
18. KISS ERZSÉBET (1999): *Növényi Molekuláris Genetika I.*
19. KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTROCCHIO, F. (2005): Flavonoids: A Colorful Model For The Regulation And Evolution Of Biochemical Pathways. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.5 May 2005
20. LI LI, D. J. PAOLILLO, M. V. PARTHASARATHY, E. M. DiMUZIO, D. F. GARVIN (2001): A Novel Gene Mutation That Confers Abnormal Patterns Of B-Carotene Accumulation In Cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *The Plant Journal* (2001) 26(1), 59-67
21. LI LI, JOYCE VAN ECK (2007): Metabolic Engineering Of Carotenoid Accumulation By Creating A Metabolic Sink. *Springer Transgenic Res* (2007) 16:581-585
22. MARTENS STEFAN, KNOTT JÜRGEN, SEITZ CHRISTIAN A., JANVARI LASZLO , YU SUN-NAM, FORKMANN GERT, ZHANG WEI (2003): Impact Of Biochemical Pre-Studies On Specific Metabolic Engineering Strategies Of Flavonoid Biosynthesis In Plant Tissues. Elsevier Science, *Biochemical Engineering Journal* Y. 2003, Vol. 14, No. 3, Pages 227-235.
23. Pék Z., Csorbainé Gógán A., Dimény J., Helyes L., Ombódi A. (2007): *Zöldségtermesztés*. Szent István Egyetem, Gödöllő.
24. QIAN-RUI, T., YOU-YUN, C., PU-HUA Z.(2003): Study On The Stability Of Anthocyanin And Ph Changes In Cell Sap Of Leaves In *Loropetalum Chinense* Var. *Rubrum*. *Hunan Forestry Science and Technology*. DOI ISSN:1003-5710.0.2003-04-006

25. RAMSAY N. A., GLOVER B. J. (2005): MYB-bHLH-WD40 Protein Komplex And The Evolution Of Cellular Diversity. *TRENDS in Plant Science* Vol.10 No.2 February 2005.
26. STRACKE, R., WERBER, M., WEISSHAR, B. (2001): The R2R3-MYB Gene Family In *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 2001, 4:447-456. Elsevier Science.
27. TAKOS, A. M., JAFFÉ, F. W., JACOB, S. R., BOGS, J., ROBINSON, S. P., WALKER, A. R. (2006): Light-Induced Expression Of a Myb Gene Regulates Anthocyanin Biosynthesis In Red Apples. *Plant Physiology*, Nov. 2006, Vol. 142, Pp. 1216-1232.
28. TANAKA, Y., OHMIYA, A. (2008a): Seeing Is Believing: Engineering Anthocyanin And Carotenoid Biosynthetis Pathways. *ScienceDirect* 2008, 19:190-197.
29. TANAKA, Y., SASAKI, N., OHMIYA, A. (2008b): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* Volume 54, Issue 4, pages 733-749, May 2008.
30. VOLDEN, J., GUNNAR B. BENGTSSON, WICKLUND, T. (2008): Glucosinolates, L-Ascorbic Acid, Total Phenols, Anthocyanins, Antioxidant Capacities And Colour In Cauliflower (*Brassica Oleracea* L. Ssp. *Botrytis*); Effects Of Long-Term Freezer Storage. *Elsevier, Food Chemistry* 112 (200) 967-976.
31. WALKER, R. A., LEE, E., BOGS, J., MCDAVID, D. A. J., THOMAS, M. R., ROBINSON, S. P. (2007): White Grapes Arose Through The Mutation Of Two Similar And Adjacent Regulatory Genes. *The Plant Journal* (2007) 49, 772-785.
32. YUAN Y., CHIU LI-WEI, LI LI (2009): Transcriptional Regulation Of Anthocyanin Biosynthesis In Red Cabbage. *Planta* (2009) 230:1141-1153.
33. ZHOU, X., JOYCE VAN ECK, LI LI (2008): Use Of The Cauliflower Or Gene For Improving Crop Nutritional Quality. *Biotechnology Annual Review* Volume 14 ISSN 1387-2656

Ábrák és Internetes hivatkozások: (2011. 10. 21-én elérhető internetes hivatkozások)

34. Antocianin Bioszintézis Ábra: [Http://Www.Florigene.Com/Sales/Regulation.Php](http://Www.Florigene.Com/Sales/Regulation.Php)

35. Pelargonidin Színskála: [Http://Www.Biologie.Uni-Hamburg.De/B-Online/D34_3/Petunie.Htm](http://Www.Biologie.Uni-Hamburg.De/B-Online/D34_3/Petunie.Htm)

36. Zöld karfiol (internet 1):

http://www.specialtyproduce.com/produce/Green_Cauliflower_3923.php

37. Romanesco karfiol (internet 2):

http://www.specialtyproduce.com/produce/Broccoli_Romanesco_5687.php

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni Katuláné Debreceni Diánának munkámhoz nyújtott segítségét, és magas szintű szakmai irányítását.

Köszönet illeti, külső konzulensemét, Dr. Galli Zsoltot, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a karfiol genetikai alapanyagot, és szakmai tanácsaival segítette munkánkat.

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Erzsébet intézet igazgatónak, hogy lehetővé tette számomra, hogy az Intézetben készítsem el a Tudományos Diákköri dolgozatomat.

Köszönöm az Intézet összes kutatójának és dolgozójának hasznos segítségét.

Köszönöm családom és csoporttársaim lelkesítését, és bátorítását.

9. Melléklet

DNS izolálás DNeasy Plant Mini Kittel

1. 0,1 g levelet elporítunk folyékony nitrogénben. A finom port Eppendorf csövekbe helyezzük.
2. A mintákhoz hozzáadunk *400 µl AP1 puffert*, ezután pedig *4 µl RNase A*-t.
3. A mintákat vortexeljük, majd 10 percre 65°C-ra helyezzük. Inkubálás közben 2-3-szor megforgatjuk a mintákat.
4. Ezután hozzámérünk a mintákhoz *130 µl AP2 puffert*, összerázzuk, és 5 percig jégen tartjuk. Ha túl viszkózus, kocsonyás lesz az elegy, 5 percig centrifugáljuk (max. fordulatszám) és a felülúszót visszük tovább.
5. A mintákat hozzáadjuk a QIAshredder-hez (lila 2 ml centrifugacső), 2 percig centrifugáljuk (max. fordulatszám)
6. Az átfolyót új centrifugacsőbe mérjük (nincs mellékelve). Az átfolyó mennyisége elvileg 450 µl.
7. A mintákhoz hozzáadunk *1,5 térfogatnyi AP3/E oldatot*, pipettával elkeverjük.
8. Ebből 650 µl-nyi mennyiséget hozzámérünk a DNase mini spin columns-hoz (fehér centrifugacső), majd 1 percig centrifugáljuk 8000 rpm-nél nagyobb fordulatszámon.. Az alul megjelenő folyadékot kiöntjük.
9. A maradék oldattal megismételjük az előző lépést. A folyadékot itt is kiöntjük.
10. A DNS-t tartalmazó felső részt áthelyezzük a mellékelt Eppendorf csőbe, és hozzámérünk *500 µl AW puffert*. 1 percig centrifugáljuk 8000 rpm-nél nagyobb fordulatszámon.. Az alul megjelenő folyadékot kiöntjük.
11. Megismételjük az előző lépést, de most 2 percig centrifugálunk maximális fordulatszámon.
12. Az oszlopot új Eppendorf csőbe helyezzük.
13. *100 µl 65°C-os AE puffert* mérünk a membránra, 5 percig inkubáljuk szobahőn, majd 1 percig centrifugáljuk 8000 rpm-nél magasabb fordulatszámon.
14. Az előző pontot megismételjük a mintákon. Az átfolyó folyadék tartalmazza a DNS-t.

10. Nyilatkozat

Alulírott Bedzsó Gabriella nyilatkozom, hogy a Tudományos Diákköri Dolgozat a saját munkám, a felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem és a vonatkozó jogszabályokat betartottam.

.....