

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet

KLOROPLASZT POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA TERMESZTETT LUCERNA FAJTÁKBAN

Készítette: Pesti Réka
Évfolyam: Mezőgazdasági Biotechnológus 2. évf.

Belső konzulens: Veres Anikó
Beosztása: egyetemi adjunktus, SZIE

Külső konzulens: Dudás Brigitta
Beosztása: tudományos munkatárs, MBK

Gödöllő
2012

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés és célkitűzések	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Gazdasági jelentőség	6
2.2 Lucerna fajták.....	7
2.3 A lucernanemesítés sajátosságai	7
2.4 A növényi genom szerveződése	8
2.5 Polimorfizmus	10
2.6 Polimorfizmus detektálásra alkalmas módszerek.....	10
3. Módszerek.....	14
3.1 Növények ültetése, nevelése.....	14
3.2 DNS izolálás.....	14
3.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)	15
3.4 DNS kicsapás	16
3.5 Gélelektroforézis	16
3.6 Fragment izolálás	16
3.7 Szekvenálás	17
4. Eredmények	18
4.1 <i>trnI-rpl23</i> intergénikus régió	18
4.2 <i>trnE-trnT</i> intergénikus régió.....	26
4.3 <i>accD</i> gént kódoló régió	27
5. Értékelés és következtetések	33
6. Összefoglalás	36
7. Köszönetnyilvánítás	38
8. Irodalomjegyzék.....	39
9. Mellékletek.....	44

10.	Nyilatkozat	49
-----	-------------------	----

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cDNS	Complementer Deoxiribonukleinsav
cpDNS	Kloroplaszt DNS
dATP	Deoxyadenosine-triphosphate
dCTP	Deoxycytidine-triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine-triphosphate
DNS	Deoxiribonukleinsav
dTTP	Deoxythymidine-triphosphate
DV	Desztillált víz
EST	Expressed Sequence Tags
IR	Inverted Repeat
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
LSC	Large Single-Copy
mRNS	Messenger Ribonukleinsav
mtDNS	Mitokondriális Deoxiribonukleinsav
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Locus
RAPD	Random Amplified Length Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNS	Ribonukleinsav
rRNS	Riboszómális Ribonukleinsav
RY	<i>Medicago Sativa</i> RegenSY vonal
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Single Sequence Repeat
SSR	Small Single-Copy
TBE	Tris/Borate/EDTA
tRNS	Transfer Ribonukleinsav

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A lucerna (*Medicago sativa* L.) kiváló beltartalmi értékei miatt az egyik legértékesebb és legváltozatosabban hasznosítható takarmánynövényünk. Jelentős gazdasági szerepéhez, a takarmányozásban betöltött szerepén túl, a nitrogén megkötése és a talaj termékenységének fokozása segítette. A lucerna idegentermékenyülő, rovarbeporzású, autotetraploid, évelő növény, melyek együttesen igencsak megnehezítik a nemesítést és a molekuláris kutatásokat.

A növényi sejtben három, egymástól fizikailag is elkülönült genomot különböztetünk meg: nukleáris, mitokondriális és kloroplasztisz. Kizárólag a növényi sejtekre jellemző kloroplaszt saját kétszálas, gyűrű alakú, haploid DNS-sel rendelkezik melynek, legfontosabb jellegzetessége, hogy két fordítva ismétlődő (IR) szekvenciát tartalmaz. A *Medicago sativa* kloroplaszt genomjából hiányzik az egyik IR szekvencia, ezáltal csökken a genom szerkezet stabilitása, mely nagymértékű heterogenitást eredményez. Ezek a polimorfizmusok molekuláris markerként felhasználhatóak kloroplaszt öröklődésének tanulmányozására, a filogenetikai kapcsolatok kutatására és a kimutatott különbségek felhasználhatóak fajtaazonosításra és a fajtavédelemben is.

Dolgozatom célja Magyarországon termesztett lucernafajták kloroplaszt genom polimorfizmusának vizsgálata, a fajtákon belüli és a fajták közötti variabilitás elemzése.

Három magyarországi nemesítő helyről (Kisvárd, Szarvas, Kompolt) származó 2-2 fajtát választottunk, melyekhez kereskedelembe kapható, étkezési célra árusított holland és kanadai magkeveréket hasonlítottunk és a laboratóriumunkban használt RegenSY vonalat alkalmaztuk kontrollként. A vizsgálat a kloroplaszt genom három különböző régiójára irányult. Fajtánként minimum 15 db egyedből DNS-t izoláltunk és PCR-t készítettünk a vizsgálandó régióra specifikus primerekkel. A PCR termékeket gélelektroforézissel elválasztottuk és a hossz polimorfizmust mutató egyedekben szekvenálással igazoltuk a DNS szekvenciában bekövetkezett változásokat.

Vizsgálataink során kimutatott polimorfizmusokból molekuláris markerek fejleszthetők, amelyek alkalmasak lehetnek a kloroplaszt öröklődésének tanulmányozására és felhasználhatóak fajtaazonosításra és a fajtavédelemben is. Jövőbeni terveink között szerepel a kloroplaszt genom további régióinak feltérképezése és a fajták közötti polimorfizmusok analízise.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Gazdasági jelentőség

A lucerna a legértékesebb szálatakarmány növényünk, melynek magyarországi meghonosodása Tessedik Sámuel nevéhez fűződik, aki 1770-ben elsőként próbálkozott a lucerna megtelepítésével Szarvason. Hazánkban jelenleg 4,2-4,5 millió hektáron folyik szántóföldi növénytermesztés, melyen a kukoricát, búzát és az árpát követően a lucerna a negyedik legnagyobb területen termesztett növényünk. Magyarországon a KSH adatai szerint 2011-ben a termőterülete 140 ezer ha volt, melyről kb. 557 ezer tonna szénát takarítottak be.

Jelentős gazdasági szerepéhez, a takarmányozásban betöltött szerepén túl, a termesztése során fellépő számos kedvező tulajdonsága is segítette. Mindenekelőtt jelentős nitrogént hagy vissza a talajban, (100 kg/ha N), valamint dúsan elágazó gyökérzetével növeli a talaj szervesanyag-tartalmát (30-50 t/ha), továbbá mikrodrénező és morzsaképző hatású, ezáltal radikálisan hozzájárul a talaj termékenységének javításához. (KÉSMÁRKI 2005, BÓCSA 1979)

Termesztése biztonságos, mivel a kedvezőtlen időjárási viszonyokat jól tolerálja, valamint nitrogén szükségletének legnagyobb részét a légköri nitrogén megkötésével fedezi. Ezáltal elkerülhetjük a túlzott nitrogén műtrágyázás okozta talajszennyezést, mely a növénytermesztésben igen gyakori probléma. Termesztése jól gépesíthető, de nem igényel évente visszatérő talajmunkát. Ezek kedvezően befolyásolják a termesztési költségek alakulását is. (KÉSMÁRKI 2005)

Takarmánynövényként főleg a kérődzők esetén használják, de más állatok takarmányozásánál is felhasználható. (IZSÁKI 2004, KÉSMÁRKI 2005) Magas fehérje tartalmán túl, kedvező az aminosav-összetétele, valamint jelentős mennyiségű meszet is tartalmaz. Vitaminokban gazdag, főként az A-vitamin provitaminjában, a β -karotinban. (VARGA 1996) A lucerna a legolcsóbb és legnagyobb mennyiségű karotin forrás. (BÓCSA 1979) Fontos megemlíteni szaponin tartalmát, mely a szervezet egyes folyamatait károsan befolyásolhatja, de szerencsére már rendelkezésünkre állnak szaponin szegény, illetve teljesen szaponin mentes fajták. (VARGA 1996) Értékét tovább növeli, hogy sokoldalúan hasznosítható az állattenyésztésben, mind zölden, silózva, szenázsként, szénának szárítva, zöldlisztként, vagy granulátumként, valamint abraktakarmányok részeként. (HTTP1) Alapvetően a tömegtakarmány előállítása a legfőbb cél, de hazánk kedvező ökológiai adottságai miatt világviszonylatban is kiemelkedőek vagyunk a lucernamag termesztésben. (IZSÁKI 2004)

A lucerna humáncélú felhasználása sem elhanyagolható, hiszen magas vitamintartalma miatt a lucernacsíra fogyasztása kedvező a szervezetre. Homeopátiás készítmények alapanyagául szolgál, valamint a lucernából kinyert xantofil és klorofil a kozmetikai ipar adalékanyagként hasznosítja. (VARGA 1996, KÉSMÁRKI 2007)

2.2 Lucerna fajták

A hazánkban található négy kultúrfajon kívül (*Medicago sativa*, *M. falcata*, *M. varia* és *M. lupulina*) más *Medicago* fajok is termesztethetők (pl. *M. truncatula*). Ezen kívül rengeteg vad faj található a természetes flórában, melyek a jövőben fontos genetikai alapanyagul szolgálhatnak a nemesítés számára. Magyarországon főként *M. sativa*-t termesztenek és ma is több helyen folyik lucernanemesítés az országban. (BÓCSA 1979) Jelenleg a nemzeti fajtajegyzék alapján 30 államilag elismertfajta van forgalomban. (ORSZÁGOS MEZŐGAZDASÁGI MINŐSÍTŐ INTÉZET 2012)

2.3 A lucernanemesítés sajátosságai

A lucerna számos olyan genetikai sajátossággal rendelkezik, melyek megnehezítik mind a nemesítését, mind a genetikai kutatásokat. (HAJÓSNÉ NOVÁK 2007A)

A legnagyobb nehézséget az okozza, hogy természetes autotetraploid növény, azaz négy homológ genomot tartalmaz. A lucerna ezenfelül a rovarmegporzású (vadméhek), idegentermékenyülő növények csoportjába tartozik. Képes jelentős mértékű öntermékenyülésre is, ezt az előnyt gyakran kihasználják a nemesítés során. A beletenyésztést nem tűri, ezáltal beltenyésztéses depresszió lép fel. (HAJÓSNÉ NOVÁK 2007A) A szintetikus fajtákat biotikus és abiotikus rezisztenciára nemesítik, mely során nagy egyedszámú szülői populációból többszöri szelektálással válogatják ki a megfelelő egyedeket. (BÓCSA 1979, PEPÓ 2011, HAJÓSNÉ NOVÁK 2007b)

2.4 A növényi genom szerveződése

Az eukarióta szervezetekben a genetikai információ 3 egymástól elkülönült organelumban: a sejtmagban (nukleáris genom), a mitokondriumban (mitokondriális genom) és a kloroplasztban (plasztom) található meg. A sejtmag tartalmazza a genetikai információ 99,9%-át, a maradék kicsiny, de fontos rész, pedig a kloroplasztban (cpDNS) és a mitokondriumban (mtDNS) helyezkedik el. (HESZKY 2010)

Az endoszimbionta elmélet szerint (MARGULIS 1967) az eukarióta sejt egy ősi formája sok milliárd évvel ezelőtt bekebelezett egy alfa-proteobaktériumot és egy cianobaktériumot. Ezek integrálódtak a sejtbe és a mai napig külön sejtorganelumként (mitokondrium és kloroplaszt) vesznek részt a sejt működésben. Funkciójuk teljes ellátásához és replikációjukhoz azonban sejtmagi kooperáció szükséges, mert az evolúció során bekövetkezett a genetikai autonómiájuk elvesztése. (KIRÁLY 2007, MARTIN 2003)

A növényi sejtmagban található DNS akár 10^8 - 10^{10} bázispár méretű is lehet. (ARUMUGANATHAN & EARLE 1991) A lineáris kétszálú DNS 8 db hiszton fehérjére csavarodva nukleoszómát, további rövidüléssel szolenoid szerkezetet vesz fel, majd scaffold proteinekhez kötődve még tovább rövidül, mígnem kialakul a kromoszóma szerkezet. A kromoszómák alakja, mérete és száma fajra jellemző. Növényekben a kromoszómák méretétől függetlenül mintegy 30.000-40.000 gén található. (MÁTYÁS et al. 2002, SUTKA 2004)

A mitokondrium cirkuláris, kettős szálú, haploid DNS-t tartalmaz, mely 200-2500 kb méretű, ez a méret akár fajták között is különbözhet. A sejtben belül akár 100.000 mitokondrium is lehet és mitokondriumonként 10-30 kópiában található meg a mtDNS. A mitokondriális DNS körülbelül 40-50 gént tartalmaz, nagyrészt ismétlődő szekvenciákból és nem kódoló DNS szakaszokból áll. (MÁTYÁS et al. 2002)

Az organelum, amely fontos szerepet játszik a fotoszintézisben és más alapvető anyagszállítási folyamatokban a kloroplaszt. (MAPLE & MØLLER 2007) A sejtben akár 100 kloroplaszt és kloroplasztonként 10-100 kópia DNS is előfordulhat. (SHAVER et al. 2006, ZOSCHKE et al. 2007) A kloroplaszt DNS mindössze 120-218 kb méretű és körülbelül 50-200 fehérjét kódol. (CHUMLEY et al. 2006, WAKASUGI et al. 2001) Az evolúció során a kloroplasztban lévő gének egy része elveszett, míg más gének átadódtak a sejtmagba, (XIONG et al. 2009) így a mai kloroplasztis mintegy 5-10%-át kódolja azoknak a géneknek, melyek az őseikben voltak. (MARTIN et al. 2002) LEE et al. (2007) arról számoltak be, hogy cpDNS-ben a gének sorrendjének és összetételének megváltozását inverzió, transzpozíció, gén duplikáció, gén/intron kiesése, inszerció/delécio és a fordítva ismétlődő szakaszok hosszának változása okozta.

A cpDNS két Inverted Repeat (IR) szekvenciát tartalmaz, melyek hosszúsága 12-75 kb is lehet, ezek választják el egymástól a kisebb egy-kópiás (SSR=Small Single-Copy) szakaszt és a nagyobb egy-kópiás (LSC=Large Single-Copy) szakaszt. (LEE et al. 2007) Ezek az IR szekvenciák többek között rRNS géneket kódolnak, melyek erősen konzervatív szakaszok így alkalmasak filogenetikai kutatásokra.

Kloroplaszt prokarióta eredetét számos tulajdonságban mutatott hasonlóság támasztja alá. Egyik ilyen tulajdonság a hasadással történő osztódás, mely a sejt osztódásától függetlenül zajlik. Az utód sejtekben a kloroplaszt, mérete és száma fokozatosan növekszik, míg el nem éri az anyasejtre jellemző értéket. További hasonlóságot figyeltek meg a kloroplaszt genom (cpDNS) alakjában és felépítésében, mely során a funkcionálisan összetartozó gének clustereket alkotva együtt íródnak át. Ugyancsak bizonyítékként szolgál egyes gének (rRNS-, tRNS-, RNS polimeráz alegységek) méret és szekvencia hasonlósága. A prokarióta eredetet igazolja, hogy a kloroplaszt fehérjeszintézise nehezen gátolható az eukarióták fehérjeszintézisét leállító anyagokkal, (cikloheximid) míg a prokariótákra ható antibiotikumokkal (kloramfenikol, eritromycin) azonnali eredmény érhető el. Azonban a cpDNS génjei az eukariótákhoz hasonlóan tartalmaznak exon és intron szakaszokat, továbbá számos génje önálló szabályozású. (KIRÁLY 2007)

Számos növényi kloroplaszt genom teljes szekvenciája ismert, (például: *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Pinus tunbergii*, *Zea mays*, *Oenothera elata*, *Medicago truncatula*) melyek fontosak a filogenetikai kutatásokban, a zárvatermők rokonsági kapcsolatának vizsgálatában. (RUHLMAN et al. 2006, HEINZE 2007)

A sejtmagban kódolt tulajdonságok Mendeli módon öröklődnek, míg az organelum genomban kódolt génekre a nem-mendeli öröklődés jellemző, ami lehet uniparentális vagy biparentális. Az uniparentális öröklődés esetében az utód, vagy az egyik vagy a másik szülőtől, míg a biparentális öröklődés esetében mindkét szülőtől örököl. A kloroplaszt genom öröklődése a zárvatermők 80%-ában anyai és a maradék 20%-ban biparentális jelleget mutat, míg a mitokondriális genom majdnem kizárólagosan anyai öröklődést mutat. Ezzel szemben a nyitvatermők cpDNS-ére apai és a mtDNS-ére anyai öröklődés jellemző. (BIRKY 2008, HESZKY & GALLI 2008) A *Medicago* nemzetségre általánosságban az apai öröklődés, (SMITH 1989, MASOUD et al. 1990) de egyes tagjaira a biparentális öröklődés (JOHNSON & PALMER 1989) jellemző. MATSUSHIMA et al. (2008) *Medicago truncatula* cpDNS-ének öröklődését vizsgálta, melynek eredményei egyértelműen biparentális öröklődést mutattak, melynél az F1-nemzetségben megjelenő kevert cpDNS populáció hasonlít, a *M. sativa* esetén előforduló heteroplasztómikus állapotra. A *Medicago* nemzetségre jellemző, hogy a kloroplaszt genomból hiányzik az egyik IR szekvencia, amely felelős lehet azért, hogy jóval nagyobb számban fordulnak elő a mutánsok, amit a cpDNS polimorf mintázata igazol. (JOHNSON & PALMER 1989) JOHNSON & PALMER (1989) munkájuk során

több olyan cpDNS régiót azonosított, mely nagyfokú variabilitást mutatott és megállapították, hogy több cpDNS típus is létezik, azaz a *Medicago* nemzetségben nem ritka a heteroplasztómikus állapot.

Filogenetikai kutatások esetében fontos ismerni a kutatott faj/fajta organelumaira jellemző öröklődést. Heteroplasztómikus egyedeknél a különböző kloroplaszt típusok jelenléte egy egyedben belül a megnehezíti a filogenetikai elhelyezést, mivel ezek akár különböző kládból származó cpDNS-ek is lehetnek. (WOLF & RANDLE 2004, HANSEN et al. 2007)

2.5 Polimorfizmus

A polimorfizmus görög eredetű szó, melynek jelentése morf vagy változat. (GRIFFITHS et al. 2000) A genetikai polimorfizmusnak 3 típusát különböztetjük el: fenotípusos, kromoszómális, molekuláris. (HESZKY & GALLI 2008) A DNS szekvenciában bekövetkezhet bázispár kiesés/kicserélődés, szekvencia kiesés/beékelődés, szekvencia ismétlődés és átrendeződés, ezek öröklődnek és a populáció több mint 1%-ában jelen vannak. A változások bekövetkezhetnek kódoló vagy nem kódoló régióban és megváltoztathatják a gén működését is. (KIMBALL 2011)

2.6 Polimorfizmus detektálásra alkalmas módszerek

A molekuláris technikák alkalmazásával lehetőség nyílik a fajok evolúciójának kutatására és a genetikai variabilitás eloszlásának és mértékének vizsgálatára a fajokon belül és fajok között. (MONDINI et al. 2009) A genetikai variabilitás vizsgálata segíthet megérteni a növényekben megjelenő biológiai jelenségek molekuláris hátterét. (AGARWAL 2008) A molekuláris technikák a genomi DNS vizsgálatán kívül használhatók mitokondriális- és kloroplaszt DNS polimorfizmus tanulmányozására is. (MONDINI et al. 2009)

2.6.1 Hibridizáción alapuló módszerek

Az **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) technikánál a DNS restrikciós emésztését követően Southern hibridizációt végeznek kémiai jelzett próbával. A polimorfizmus a restrikciós helyek eloszlásának különbözőségéből adódik, melyet okozhat SNP, inszerció, delécio, szubsztitúció. Az RFLP markerek előnye, hogy nagyfokú polimorfizmust mutatnak, kodominánsan öröklődnek, nem szükséges a templát DNS szekvenciájának az ismerete és jól reprodukálható eredményt adnak. Ezek ellenére használata nem elterjedt mivel, időigényes, drága és a hibridizációhoz próbát kell előállítani, amit radioaktív vagy egyéb kémiai jelöléssel kell ellátni. (KISS 1999, HESZKY et al. 2005, AGARWAL 2008, MONDINI et al. 2009) BRUMMER et al. (1991) emésztést végeztek az EcoRI, a BamHI és a HindIII enzimmel, majd a fragmentek mérete alapján variabilitást mutattak ki diploid és tetraploid alfalfa fajokon belül és a fajok között.

2.6.2 PCR-alapú technikák

A **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) módszer alapja, hogy véletlenszerűen megválasztott rövid oligonukleotidokat használnak a PCR-hez, a terméket ethidium bromiddal festett agaróz gélen választják el. A RAPD markerek előnye, hogy nagyfokú polimorfizmust mutatnak, nem szükséges a templát DNS szekvenciájának ismerete és kis mennyiségű DNS is elég az eljárás elvégzéséhez. A módszer hátránya, hogy az eredmény reprodukálhatóságát nagyban befolyásolják a reakció körülményei, érzékeny a DNS tisztaságára és minőségére, továbbá domináns marker. (KISS 1999, HESZKY et al. 2005, AGARWAL 2008, MONDINI et al. 2009) NAGL et al. (2011) RAPD markerekkel, öt tetraploid lucernafajta genetikai variabilitását és rokonsági kapcsolatát vizsgálták. A fajtákon belül nagymértékű variabilitást tapasztaltak RAPD primerek alkalmazásával, mely megegyezett MENGONI et al. (2000), NOEPVARVAR et al. (2008), MOHAMMADZADEH et al. (2011) által kapott eredményekkel és ezt a nagymértékű variabilitást a lucerna idegentermékenyülésének és ploidia fokának tulajdonították.

Az **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) módszer a DNS restrikciós emésztésének és szelektív PCR amplifikációnak az együttes alkalmazásából áll. A genomi DNS-t emésztik egy ritkán és egy gyakran hasító enzimmel, az így kapott túlnyúló végekre adaptereket ligálnak, majd szelektív és jelölt primerekkel PCR-t készítenek, a terméket poliakrilamid gélen szétválasztják. Az AFLP előnye hogy, nagyfokú polimorfizmust mutat, nem szükséges előzetes szekvencia ismeret, kis mennyiségű DNS is elegendő és jól reprodukálható. Az eljárás hátránya, hogy érzékeny a DNS tisztaságára és minőségére, domináns markert eredményez és jelölt primereket igényel. (HESZKY et al. 2005, AGARWAL 2008) KEIVANI et al. (2010) Iránban termesztett lucerna fajtákat vizsgáltak, AFLP szelektív primerekkel. Kísérleteik során bebizonyosodott, hogy nincs összefüggés a fajták genetikai távolsága és a származásuk földrajzi távolsága között, ez megerősítette TUCAK et al.(2008) és TOULI et al. (2008b) korábbi kísérleteit. Az eredmények igazolták, hogy az AFLP marker kiválóan alkalmas molekuláris polimorfizmus detektálására és filogenetikai kapcsolatok kimutatására. (KEIVANI et al. 2010)

Az **EST** (Expressed Sequence Tags) szekvenciák olyan molekuláris markerek, melyek fehérjéket kódoló géneket reprezentálnak. Különböző fejlődési stádiumban RNS izolálnak, majd az arról készített cDNS-t klónozzák, szekvenálják és az eredményt adatbázisban rögzítik. A szekvenciákra tervezett primerekkel összehasonlító térképezést végeznek. (HESZKY et al. 2005, MONDINI et al. 2009)

A **mikroszatellit** vagy SSR (Simple Sequence Repeat) markerek. Az SSR-ek a genomban nagy mennyiségben előforduló 2-6 bázispárból álló ismétlődő motívumok, melyek száma fajokon belül és fajok között is változó, ennek oka a DNS replikációja során bekövetkező slippage. Határszekvenciákra tervezett primerpárokkal, eltérő méretű fragmentumok szaporodnak fel a PCR

során, azután hossz polimorfizmus detektálható, ami egyedi „ujjlenyomat” meghatározására alkalmas. Előnye, hogy nagyfokú polimorfizmust mutat, kodominánsan öröklődik, az eredmények jól reprodukálhatóak és diploid fajok esetében a pontos allélméret is meghatározható. Hátránya, hogy a primerek kifejlesztése idő- és költség igényes, a fragmentumok elválasztásához nagy felbontóképességű poliakrilamid gél kell és az allélméretezéshez a primerek fluoreszcens jelölése szükséges. (KISS 1999, PROVAN et al. 2001, HESZKY et al. 2005, AGARWAL 2008, MONDINI et al. 2009) JULIER et al. (2003) és SLEDGE et al. (2005) termesztett tetraploid lucernánál *Medicago truncatula* EST adatbázisában szereplő SSR és/vagy AFLP markerek segítségével kapcsoltsági térképet készítettek, melyet a későbbiekben termesztési szempontból jelentős QTL-ek azonosítására használtak. FLAJOULOT et al. (2011) SSR markereket alkalmaztak azonos nemesítésből származó fajták vizsgálatára, mely során a fajták és a nemesítési alapanyag különbözőségét vizsgálták. TOULI et al. (2008a) *Medicago sativa*-nál ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) technikát használták genetikai variabilitás vizsgálatra, mely során 19 primert alkalmaztak 29 egyednél. Rendkívül jó eredményt értek el, a polimorfizmus százalékos aránya 60 % volt.

SNP-nek (Single Nucleotide Polymorphism) nevezzük a genom szekvenciájában lévő egyetlen nukleotid eltérést, melyek molekuláris markerként alkalmazhatóak, mivel eltérő számban és eloszlásban fordulnak elő a fajták között és a fajtákon belül is. (AGARWAL 2008, MONDINI et al. 2009) Nem-kódoló régióban gyakrabban fordulnak elő, de a kódoló régióban is megtalálhatóak és megváltoztathatják az aminosav szekvenciáját vagy módosíthatják az mRNS érését, mely fenotípusos különbségekhez vezet. (SUNYAEV et al. 1999) Az SNP analízist az allélvariációk szekvenálásával, allél-specifikus amplifikációval, amplifikált szekvencia restrikciós hasításával, hibridizációval, tömegspektrometriával, vagy DNS chip technológiával végzik. Alkalmas növényfajták azonosítására és genetikai térképezésre. (SOBRINO et al. 2005, AGARWAL 2008, MONDINI et al. 2009)

Az eddigiek során említett hibridizációs és PCR-alapú módszerek kiválóan alkalmasak a kloroplaszt genom vizsgálatára. BADR et al. (1994) a *Genistae* alnemzetségben kerestek a restrikciós hasítóhelyekben megjelenő különbséget. Több kísérletben vizsgálták a restrikciós hasítóhelyek változását a kloroplaszt genomban – RIESEBERG et al. (1988) *Helianthus*, HOSAKA (1986) *Solanum*, PALMER et al. (1985) *Pisum* nemzetségben és BREMER & STRUWE (1992) *Rubiaceae*, SPOONER et al. (1993) *Solenaceae*, JANSEN et al. (1990) *Asteraceae* családban – filogenetikai kutatások céljára. MASOUD et al. (1989) RFLP alkalmazásával bizonyították, hogy alfalfa keresztezések során az apai cpDNS gyakrabban adódik át az utódokba, azaz többségében apai öröklődés történik.

GARGANO et al. (2012) Európában termesztett burgonya (*Solanum tuberosum subsp. tuberosum*) plaztom szekvenciáját hasonlították össze a vad típusúval (*S. bulbocastanum*) azzal a céllal, hogy a variabilitás típusát és mértékét tanulmányozzák a különböző genomokban és molekuláris markereket (CAPS) fejlesszenek a biotechnológiai és genetikai kutatások számára és a nemesítés megkönnyítésére.

3. MÓDSZEREK

A kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növénybiotechnológiai Intézetében végeztük.

3.1 Növények ültetése, nevelése

Dolgozatomhoz három hazai nemesítő helyről származó 2-2 fajtát választottunk ki, az Adél kivételével, mindegyik szerepel a 2012-es nemzeti fajtajegyzékben is. Összehasonlításképpen kereskedelembe kapható, étkezési célra árusított kanadai (BiOrganik Online Kft., Származási hely: Kanada) és holland (Otthon Tuinplus Olanda, Származási hely: Hollandia) magkeveréket használtunk, a későbbiekben az egyszerűség kedvéért ezeket is fajtaként említjük. Kontrollként RegenSY-t alkalmaztunk. Az 1. táblázatban feltüntettük a vizsgálatok során használt növényfajtákat – nemesítő hely szerint csoportosítva – és az általunk használt vetőmagok előállításának évét.

1. táblázat A kísérletek során felhasznált fajták

Nemesítő hely	Kompolt	Szarvas	Kisvárd	Külföld
Fajták	KM Agro (2004) Verko (2004)	Adél (2003) Solar (2004)	Hunor40(2004) Klaudia(2004)	Holland (2012) Kanadai (2012)

A magokat Agro CS tőzeges talajjal megtöltött palántanevelő tálcákba vetettük. Az első levél kifejlődése után a palántákat kisebb földlabdával cserépbe ültettük, amihez tápsóval kiegészített földkeveréket használtunk és a továbbiakban az átültetéseket a növény növekedéséhez igazítottuk. A növények öntözése csapvízzel történt és szükség szerint kártevők elleni növényvédelmi beavatkozásokat végeztünk. Tavasz illetve nyár folyamán a növényeket többször visszavágtuk, hogy jobban bokrosodjanak.

3.2 DNS izolálás

A DNS izoláláshoz Zenogene növényi DNS tisztító kit-et (Zenon Bio Kft) és az ahhoz tartozó protokollt használtuk. Fajtanként, minden növényről kb. 100 mg mennyiségű levéllel dolgoztunk. A mintákat malommal (Biospec Mini BeadbeaterTM) homogenizáltuk. A protokolltól eltérően az eluálás két ismétlésben végeztük először 40 µl, majd 20 µl eluáló oldatot használtunk. A kétszeri eluálással növeltük a DNS kinyerés hatékonyságát. A DNS izolálást követően, NanoDrop-pal (Spectrophotometer ND-1000) DNS koncentrációmérést végeztünk, ezzel ellenőrizve az izolálás sikerességét. A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

A kloroplaszt genom három különböző régiójára specifikus primereket használtunk. A primereket eredetileg a *Medicago truncatula* kloroplaszt genomjára tervezték, melynek teljes annotált szekvenciája az NCBI adatbázisban a NC_003119 azonosító alapján megtalálható (HTTP4). A CSG1 primerek a *trnI-rpl23* intergénikus régióra specifikusak és a kloroplaszt genom 39155-39717-ig terjedő szekvenciájának vizsgálatára alkalmas. A 94K primereket a cpDNS 94073-94710 pozíciójában található *trnE-trnT* intergénikus régió vizsgálatára használtuk. Az *accD* primerek az *accD* gént kódoló régióra specifikusak és a kloroplaszt genom 67980-68746-ig terjedő szekvenciának a vizsgálatára alkalmasak.

A PCR reakcióelegy összetétele a következő: 25 µl buffer (4M KCL; 1M Tris pH 8.0; 1M MgCl₂; 100mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1µl primer mix (10 pmol/µl mindkét primerre nézve), 0.2 µl Taq-polimeráz (SZBK, 5u/µl), 1 µl DNS templát, 22.8 µl DV, végtérfogata 50 µl. Minden növényt három különböző primer párral teszteltük. A PCR primerek és a reakció körülmények a 2., 3. és 4.táblázatban találhatók. Minden lefuttatott PCR esetében alkalmaztunk egy pozitív kontrollt (RY), amely ismert DNS-t tartalmazott és egy negatív kontrollt, amelyben nem volt DNS. A mintákat további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

2. táblázat CSG1 primerekkel indított PCR reakció

Primerek neve		Szekvencia			
CSG1 F (forward)		5'GAACCCTACCTCCCATAAAGTC 3'			
CSG1 R (reverse)		5'GTCCTAGTTGATCCTGATTCGACA 3'			
Reakció körülmények					
Előmelegítés	Denaturáció	Primer kapcsolódás		Szintézis	Tárolás
95°C 04:00	40 ciklus			72°C 10:00	4°C ∞
	94°C 00:30	65°C 00:30	72°C 00:45		

3. táblázat 94K primerekkel indított PCR reakció

Primerek neve		Szekvencia			
94K F (forward)		5' TGATATGATTCGATCAGAAG 3'			
94K R (reverse)		5' TCGGAATATTACTGTTGTCA 3'			
Reakció körülmények					
Előmelegítés	Denaturáció	Primer kapcsolódás		Szintézis	Tárolás
95°C 04:00	40 ciklus			72°C 10:00	4°C ∞
	94°C 00:30	55°C 00:30	72°C 01:00		

4. táblázat *accD* primerekkel indított PCR reakció

Primerek neve		Szekvencia				
accD F (forward)		5' ATAACAACCTGTCGCAGGCAACCC 3'				
accD R (reverse)		5' TGCTTTCTGAAATCGGTATTGATAGTTCC 3'				
Reakció körülmények						
Előmelegítés	Denaturáció		Primer kapcsolódás		Szintézis	Tárolás
95°C 04:00	40 ciklus			72°C 10:00	4°C ∞	
	94°C 00:30	65°C 00:30	72°C 01:00			

3.4 DNS kicsapás

A DNS kicsapáshoz a mintákat 0,1 térfogatnyi 5M kálium-acetáttal lúgosítottuk, majd 2,5 térfogatnyi hideg abszolút alkoholt adtunk hozzá, összekevertük és egy órára -20°C-ra tettük. A mintákat 4°C-ra előhűtött centrifugában 20 percig, maximális fordulatszámmal centrifugáltuk. 250 µl 70%-os alkohollal mostuk és további 10 percig centrifugáltuk. Az alkohol eltávolítása után a DNS mintákat 5 percig vákuumos centrifugában szárítottuk, majd 22 µl DV-ben feloldottuk. NanoDrop-pal megmértük a DNS koncentrációt. A mintákat egységesen 100 ng/µl-es koncentrációra hígítottuk a könnyebb kezelhetőség miatt.

3.5 Gélelektroforézis

A PCR termék elválasztását 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM bórsav, 2,5 mM EDTA) pufferben, ethidium bromiddal (MP Biomedicals) festett, 1,2%-os agaróz (Invitrogene Life Technologies) gélen, 50 majd 100 V-os feszültség mellett végeztük.

A minták felviteléhez Thermo Scientific 6x Loading Dye festéket használtunk. A növényi mintákból 200-200 ng-ot vittünk fel a gélre. Markerként pedig 2,5 µl Fermentas 100 bp Plus Markert használtunk. A gelet GEL Logic 200 Imaging System készülékkel fotóztuk.

3.6 Fragment izolálás

A fragmentek elválasztásához 1,2%-os SeaKem agaróz gélét készítettünk. A mintákat 40 V-on, majd 90 V-on futtattuk, kb. 4 órát, amíg a fragmentek el nem váltak. A DNS fragmentek gélből való izolálását MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével végeztük, a használati utasítás alapján. A DNS koncentrációt NanoDrop-pal ellenőriztük. Majd a mintákat szekvenálásra küldtük.

3.7 Szekvenálás

A szekvenálást a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban működő BIOMI Kft. végezte. A szekvenciák összeillesztéséhez és kiértékeléséhez az interneten is hozzáférhető Reverse Complement (HTTP2) alkalmazást és a MultAlin (Multiple sequence Alignment) programot és használtuk (HTTP3).

4. EREDMÉNYEK

A vizsgált régiókon belül, fajtánként ismertetem a hossz polimorfizmus vizsgálat és a szekvencia-analízis eredményeit. A hossz polimorfizmust mutató egyedeket típusokba soroltuk és típusonként néhány mintát szekvenáltattunk, melyeket a gél fotón kék csillaggal jelöltünk. Az eredményekhez tartozó szekvenciákat és a *trnE-trnT* intergénikus régió gél képeit a mellékletekben helyeztem el. (1., 2. és 3. melléklet)

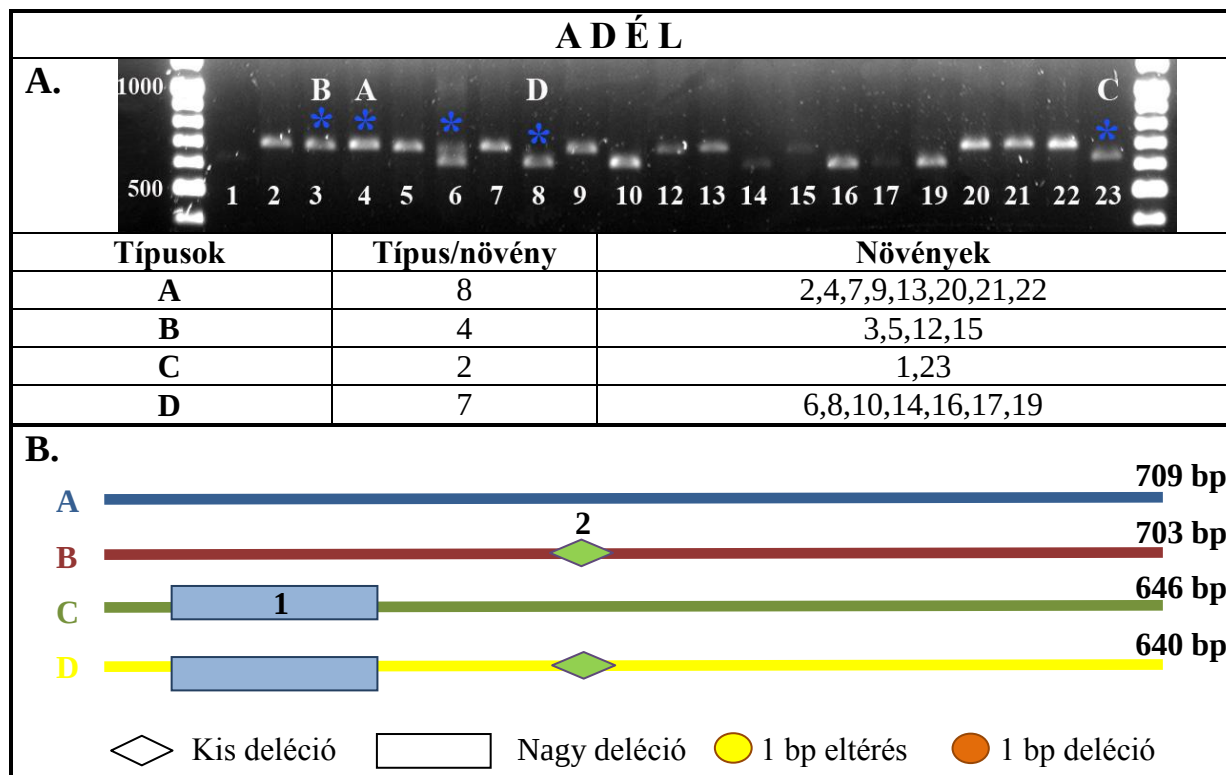
4.1 *trnI-rpl23* intergénikus régió

4.1.1 Adél

A megvizsgált 21 növényből hossz polimorfizmus alapján 4 típust tudtunk megkülönböztetni. (5/A. táblázat) Az A típusba nyolc, a B típusba négy, a C típusba kettő és a D típusba hét egyedet soroltunk.

A szekvencia analízissel szintén 4 típust tudtunk elkülöníteni, melyek szekvenciáit az 5/B. táblázatban grafikusan szemléltettük. A szekvenciában talált 2 deléció különböző kombinációban való előfordulása okozza a típusok közötti különbségeket. Az egyik deléció 63 bp (183. pozíciótól), míg a másik mindössze 6 bp (311. pozíciótól) méretű. Az A típusban egyik deléció sincsen jelen. A B típus csak a kisebbik (2), míg a C típus csak a nagyobbik (1) deléciót tartalmazza. A D típusban mind a kicsi (2) mind a nagy deléciót (1) észleltük.

5. táblázat Adél hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

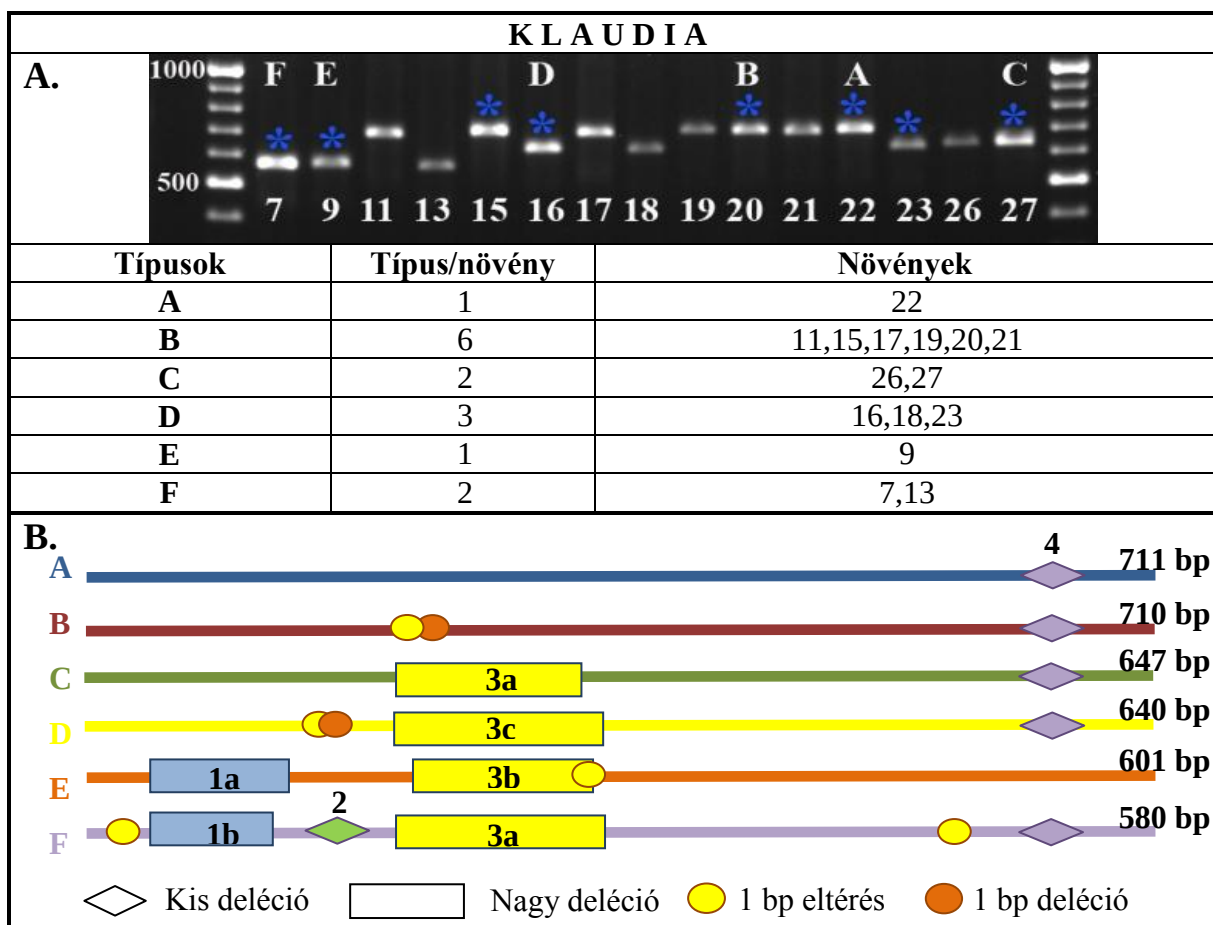


4.1.2 Klaudia

Hossz polimorfizmus alapján a megvizsgált 15 egyedből 6 típust különítettünk el. (6/A. táblázat) Az A és az E típusba egy, a B típusba hat, a C és az F típusba kettő, és a D típusba három egyed tartozik.

Szekvencia alapján 6 különböző csoportot különítettünk el (6/B. táblázat) A típusok közötti eltérést két nagyobb (1,3) és két kisebb deléció (2,4) valamint egy-egy bázis eltérés okozza. A nagyobb deléciók méretében a típusok között különbség van. Az A típus szekvenciájában csak egy kis deléció található (659. pozíciótól), míg a B típusban egy bázispár eltérést és egy bp méretű deléció (247. és 252. pozícióban) is van. A C típus szekvenciájában egy nagy (3a) és az egy kis deléció (4) található. Az D típus szekvenciájára a C típusban is meglévő deléciók jellemzőek, azonban a nagy deléció (3c) mérete eltér. Ezenfelül a D típusban van egy bázis eltérés (183. pozícióban) és egy bázispár méretű deléció (189. pozícióban) is. A E típusban eltérő kiterjedésben, de mindkét nagy deléció (1a, 3b) megtalálható és bázispár eltérés (315. pozícióban) is jelen van. Az F típusba tartozó egyedekben, mindkét nagy (1b,3a) és mindkét kisebb deléciót (2,4) tartalmazzák, továbbá a többi típustól eltérően két bázis eltérés (62. és 63. pozícióban) is kimutatható.

6. táblázat Klaudia hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

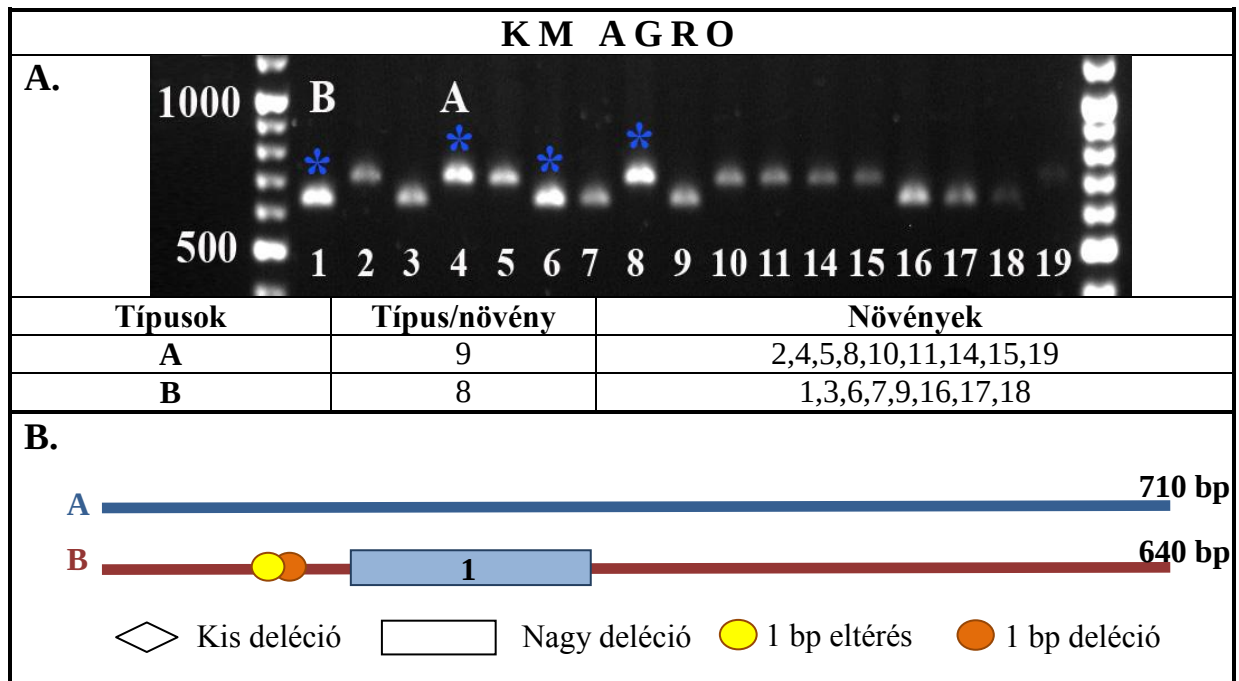


4.1.3 KM Agro

A megvizsgált 17 egyedből hossz polimorfizmus alapján 2 típust tudtunk elkülöníteni. Az A típusba 9, a B típusba 8 egyed tartozik. (7/A. táblázat)

A szekvencia-analízis szintén 2 típust találtunk, a két típus közötti különbséget a 7/B. táblázatban mutatjuk be. Az A típus és B típus közötti elsődleges különbséget egy 69 bp méretű deléció okozza. Szekvenálással bebizonyosodott, hogy a méretbeli különbségen kívül a B típusban egy pontmutáció és egy bp méretű deléció is van.

7. táblázat KM Agro hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

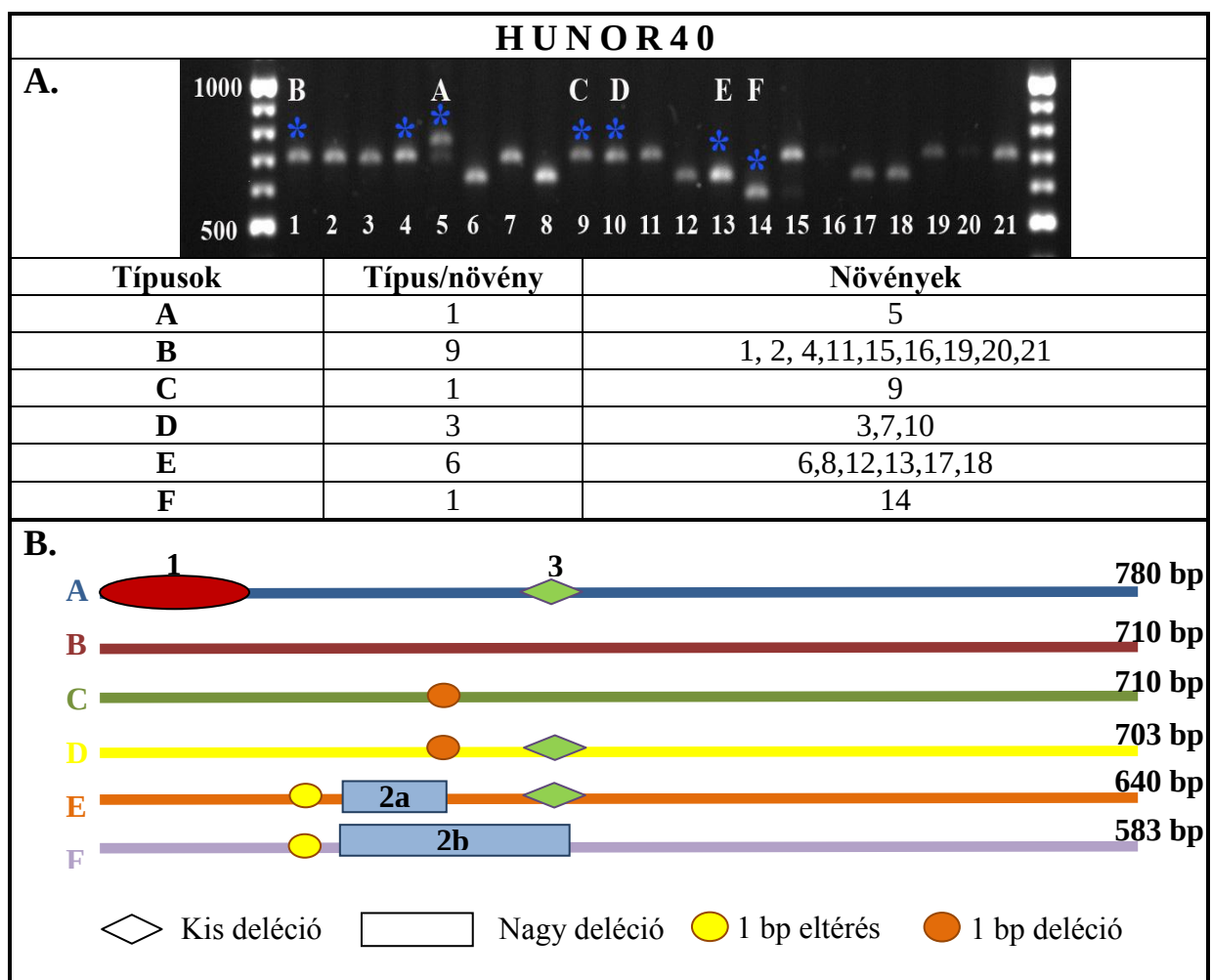


4.1.5 Hunor40

Hossz polimorfizmus alapján a 21 egyedet 6 különböző típusba soroltuk. (8/A. táblázat). Az A, C és F típusba mindössze egy-egy egyed, míg a B típusban kilenc növény sorolható. A D típusba három, az E típusba 6 egyed tartozik.

A szekvencia analízis eredményeként 6 különböző típust találtunk. A típusok közötti szekvencia különbséget grafikusán a 8/B. táblázat szemlélteti. Az A típus szekvenciája a leghosszabb és a többi típustól teljesen eltér az első 68 bp-ban (1), ezenfelül szekvenciájában egy kis deléció (3) is van. Az A típus teljes különbözősége miatt a további típusokat a B típushoz viszonyítjuk. A C típusban találtunk egy bp méretű deléciót. A D típus a C típusra jellemző variabilitás mellett tartalmaz egy 6 bp méretű kis deléciót (3) is. Az E típusban a kisebb deléción (3) túl találtunk egy 64 bp méretű nagyobb deléciót (2a) is, mellyel egyidejűleg egy bp kicserélődés is történt. F típusban az előbbi nagy deléció (2b) kétszeres méretben van jelen és a bázispár kicserélődés szintén megjelenik.

8. táblázat Hunor40 hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

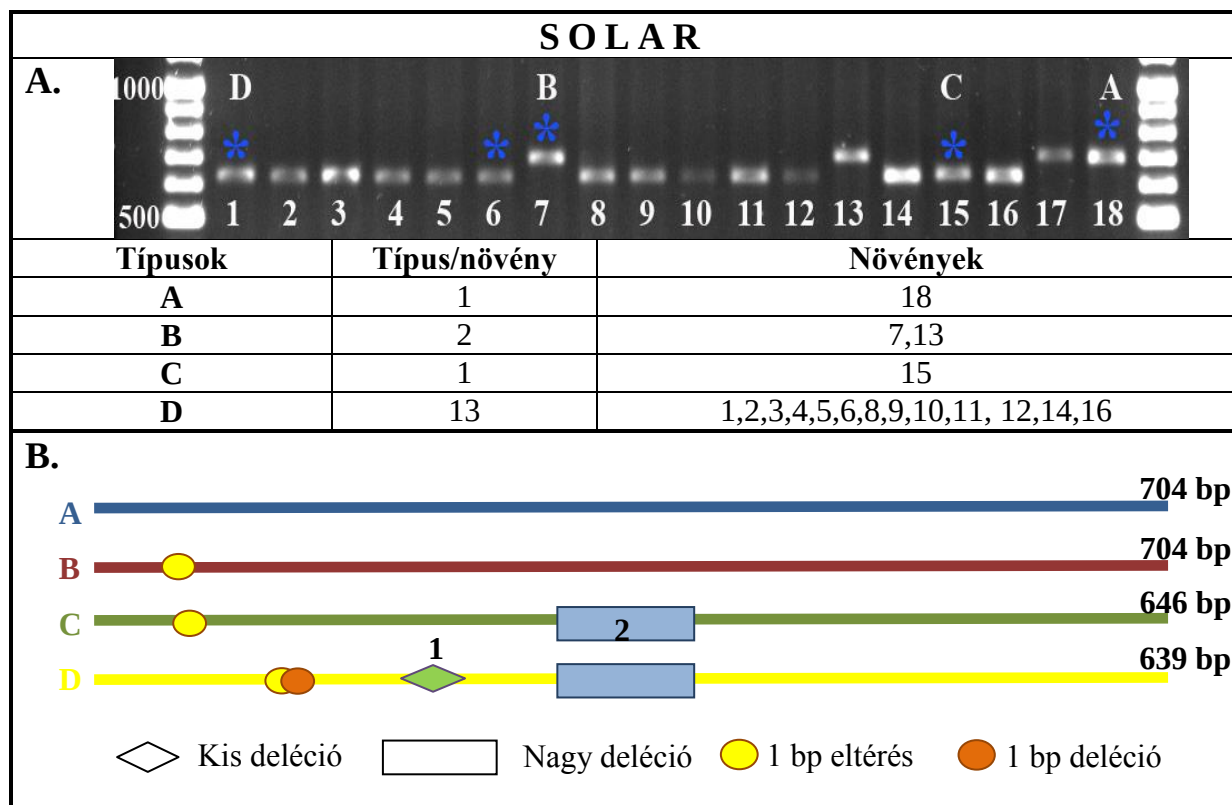


4.1.6 Solar

A gélelektroforézissel segítségével, a 18 egyedet 3 típusba soroltuk be hossz polimorfizmus alapján. (9/A. táblázat) A vizsgált növények nagy része (13 darab) a D típusba tartozik, egy-egy egyed az A és C csoportba sorolható, a maradék két egyed a B típusnak megfelelő hossz polimorfizmust mutatta.

Szekvencia-analízissel a 4 típus szekvencia szintű különbségeit azonosítottuk. (9/B. táblázat) A típusok közötti különbséget egy kisebb (6 bp) és egy nagyobb (56 bp) deléció jelenléte okozza, melyek a szekvencia közepén találhatók. Az A és a B típus hossz polimorfizmus alapján nem különült el csak szekvencia-analízissel derült ki az 1 bázisnyi különbség, egyikben sem találtunk deléciót. A C típus egyedeiben csak a nagyobb deléció (2) jelenlétét és egy bázis eltérést mutattunk ki. Az D típusban a kisebb (1) és a nagyobb deléción (2) is megfigyelhető volt, ezen túl egy bp kicserélődést és egy bp méretű deléciót találtunk.

9. táblázat Solar hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

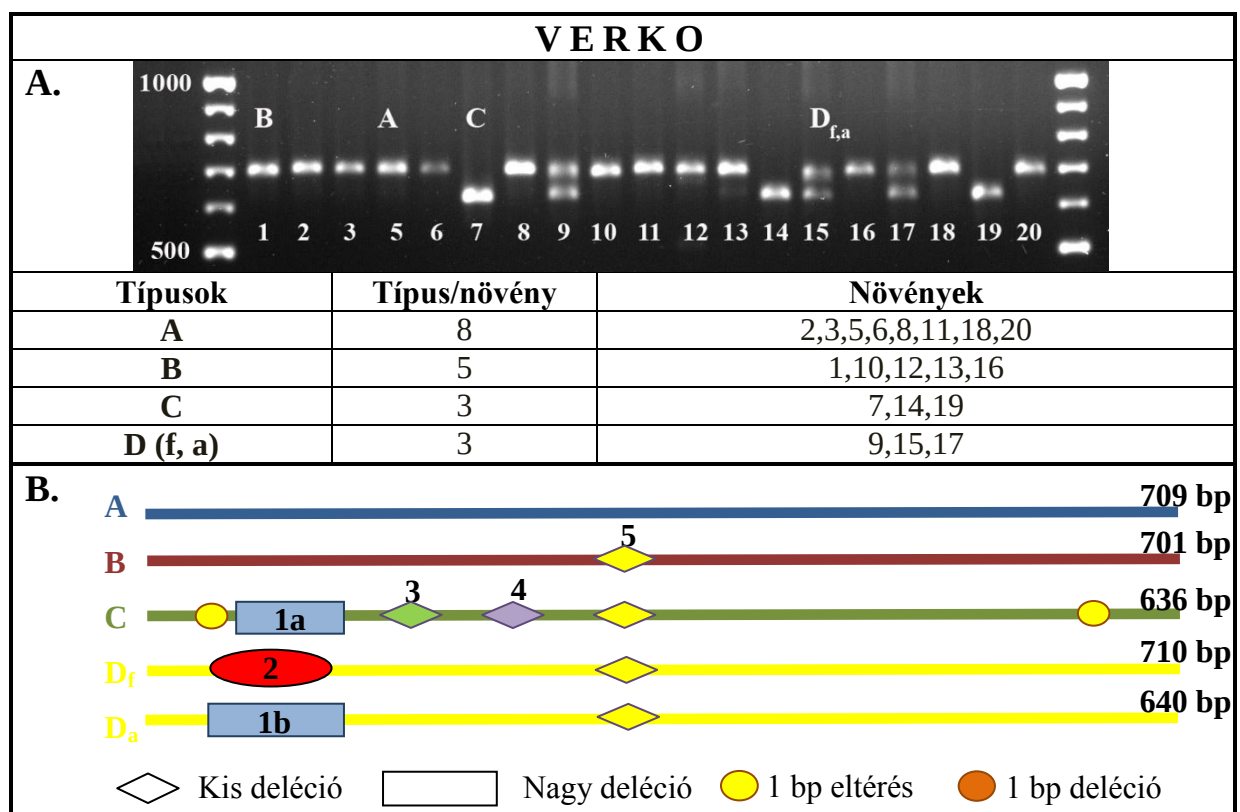


4.1.7 Verko

Hossz polimorfizmus alapján a 19 egyedből 4 jól elkülöníthető típust kaptunk, amely a 10/A. táblázatban látható. Szembetűnően az D típus eltér a többitől, mivel két fragmentet tartalmaz. Az A típusba nyolc, a B típusba öt, a C és a D típusba pedig három-három egyed tartozik.

A szekvenciák közötti különbséget a 10/B. táblázatban grafikusán szemléltettük. A típusok közötti különbséget egy nagyobb és 3 kisebb deléció különböző kombinációban való megjelenése okozza. Az A típus nem tartalmaz variábilis régiót. Az B típusban egy 6 bp méretű deléció (5) található a 311. pozíciótól. A C típus szekvenciája tartalmaz 3 darab kisebb (3,4,5) és a 73. pozíciótól egy 44 bp méretű nagyobb deléciót (1a), ezenfelül két pontmutációt (62.-és 628. pozícióban). A D típus felső fragmentjének szekvenciája kb. 50 bp méretű szakaszon (2) némi eltérést mutat a többi típustól. A D típus alsó fragmentjének szekvenciája tartalmazza a C típusban meglévő nagy deléciót (1b) és az egyik kis deléciót (5), azonban a nagy deléció mérete nagyobb és a 63. pozíciótól kezdődik.

10. táblázat Verko hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

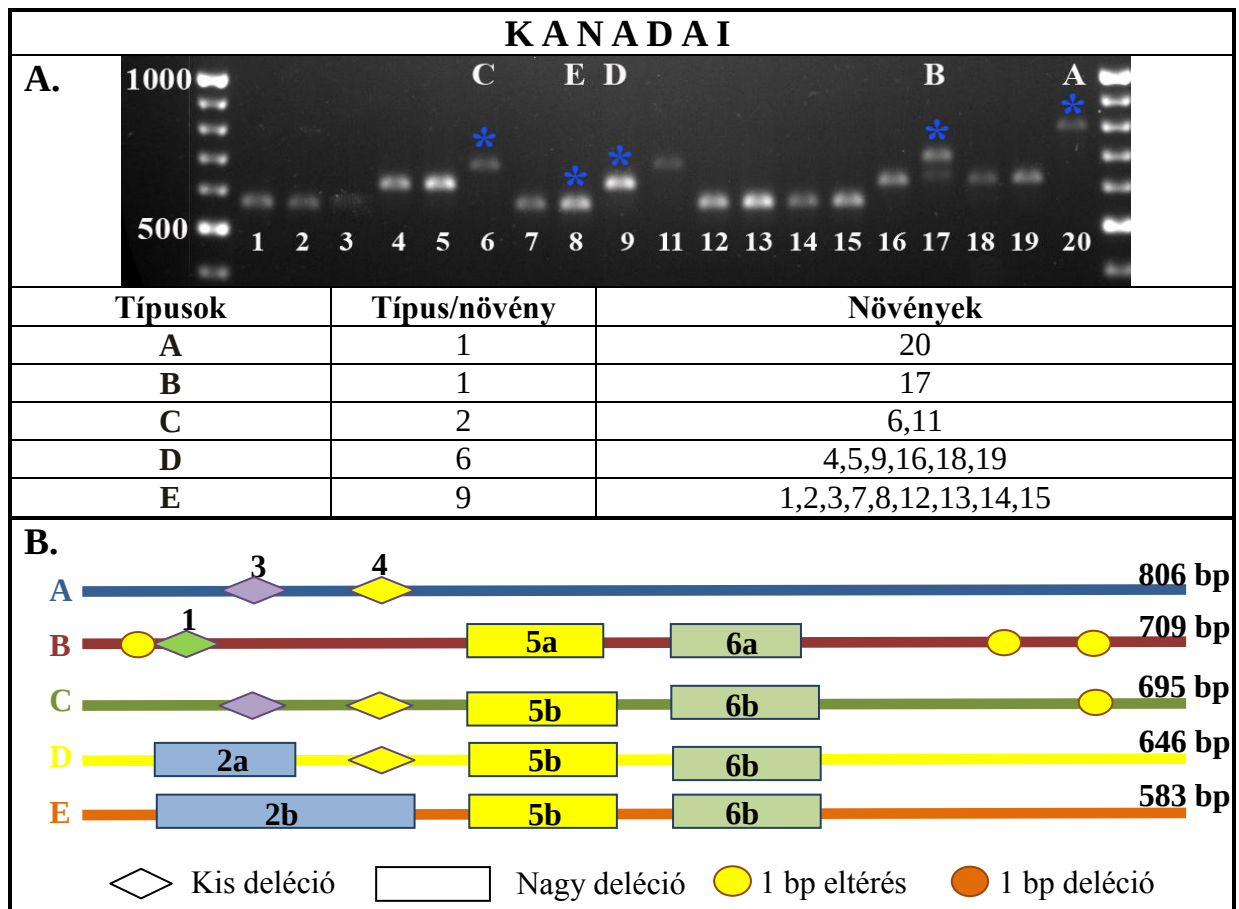


4.1.8 Kanadai

Gélelektroforézis alapján a megvizsgált 19 egyednél 5 különböző típusú hossz polimorfizmust találtunk. (11/A. táblázat) Az A és a B típusba egy-egy egyed sorolható, a C típusba kettő, a D típusba 6, míg a legtöbb egyed (9 db) az E típusba tartozik.

Szekvenálás alapján az egyedeket 5 típusba osztottuk, melyek szekvenciabeli különbségeit a 11/B. táblázatban grafikusán ábrázoltuk. Az egyes típusok fő eltéréseit három kisebb (1,3,4) és három nagyobb deléció (2,5,6) előfordulása befolyásolja. Az A típus a 126. és a 192. pozíciótól, két darab 7 bp méretű kisebb deléció (3,4) tartalmaz. A B típusra jellemző, hogy a 62. pozíciótól 2 bázispár eltérés van és találtunk még egy 9 bp méretű kisebb deléciót (1) és két nagyobb deléciót (5a,6a) is, valamint a 739. pozícióban egy bp eltérés, a 770. pozíciótól 3 bp-ban különbözik a A, D és E csoporttól. A C csoport tartalmazza az A típus kis delécióit (3,4) valamint a B típus nagy delécióit (5b,6b) és a 3 bp eltérést. A D típus szekvenciájában fellelhető a C típus egyik kisebb (4) és két nagyobb deléciója (5b,6b), továbbá a 75. pozíciótól egy 63 bp méretű deléció (2a) található. Az E típusban egy 127 bp méretű nagy deléció (2b), és D típusra jellemző két nagyobb deléció (5b,6b) is megtalálható.

11. táblázat Kanadai hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

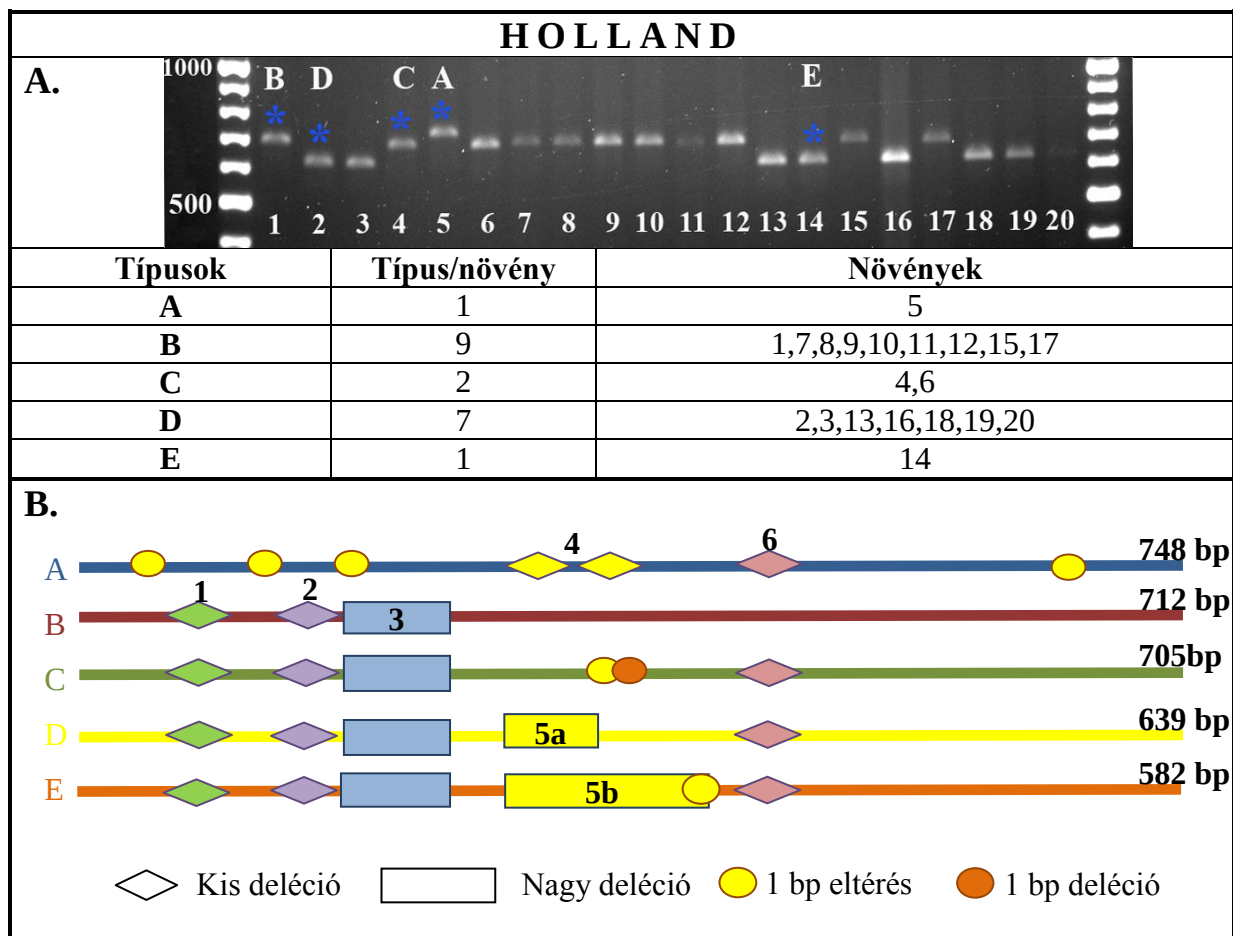


4.1.9 Holland

A megvizsgált 20 egyed közül hossz polimorfizmus alapján 5 típust különítettünk el. (12/A. táblázat) Az A és az E típusba egy-egy egyed sorolható, a C típusba kettő, a D típusba 7, míg a B típusba 9 egyed tartozik.

Hossz polimorfizmust mutató típusok szekvencia különbségeit a 12/B. táblázatban grafikusán ábrázoltuk. A típusok közötti különbséget 2 nagy és 3 kisebb deléció jelenléte/hiánya okozza és az egyik nagyobb deléció (5a,5b) méretbeli különbsége. Az A típusnál a 61. és a 127. pozíciótól két-két bázispár eltérést találtunk és további egy-egy bázispár eltérés figyelhető meg 138. és 687. pozícióban, továbbá a 241.-, a 304.- és a 370. pozíciótól három kisebb deléció (4,6) található. Az A típus különbsége miatt a B típushoz viszonyítottunk. A B típus szekvenciájában két kisebb (1,2) és egy nagyobb deléciót (3) figyeltünk meg. A C típus hasonlít a B típushoz, de tartalmaz még 1 bázis eltérést és 1 bp deléciót illetve egy kis deléciót (6) is. A D típusban két nagyobb (3,5a) és a három kisebb deléció (1,2,6) is van. Az E típus szinte megegyezik a D típussal azonban a második nagy deléciója (5b) kétszer olyan hosszú és a végén tartalmaz egy bázis eltérést.

12. táblázat Holland hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése

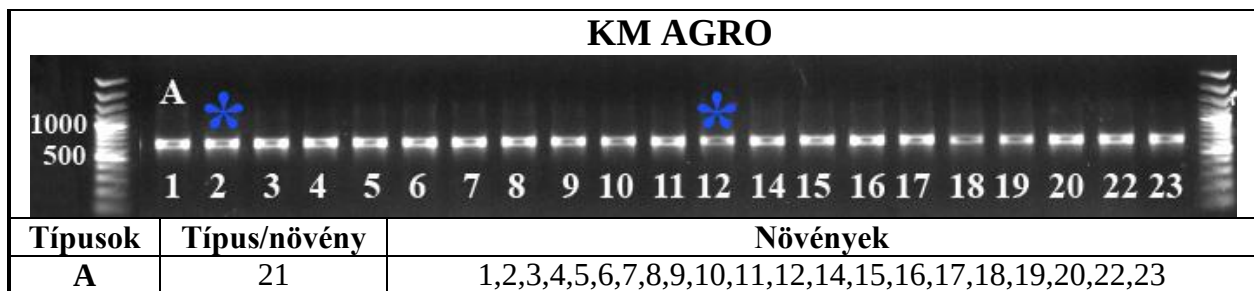


A fajták szekvenciájának összeillesztésével kiderült, a hogy szekvencia eleje (1-500-as pozícióig) nagymértékű variábilis mutat, míg a szekvencia végén (500-750-es pozícióig) A fajták szekvenciájában hasonlóságot figyeltünk meg a *trnI-rpl23* intergénikus régióban. Találtunk egy 65 bp méretű nagyobb deléciót a 75. pozíciótól, mely a Klaudia és a Kanadai fajtában is jelen van. A Klaudia két egyedében és a Verko három egyedében megtaláltuk ugyanazt a 183. pozíciótól kezdődő 7 bp méretű deléciót. A Klaudia hat egyede és a KM Agro nyolc egyede ugyanazt a 247.pozíciótól kezdődő, 71 bp méretű deléciót tartalmazza. Az Adél és a Verko 11 egyedében megtaláltuk ugyanazt a 6 bp méretű deléciót a 311. pozíciótól.

4.2 *trnE-trnT* intergénikus régió

Gélelektroforézissel egyik fajta egyedei sem mutattak hossz polimorfizmust, így egy típusba sorolható az összes egyed. A 13. táblázatban a KM Agro gél képét illesztettük, de az összes fajta esetén ugyanezt az egyöntetűséget találtuk az egyedek között. A több fajta gél képét a mellékletben (2. melléklet) helyeztük el. A szekvenálásra fajtánként véletlenszerűen kiválasztott 2-2 mintát adtunk le.

13. táblázat *trnE-trnT* intergénikus régió hossz polimorfizmus vizsgálatának eredménye a KM Agro-n bemutatva



A fajtákat szekvenciájának összeillesztésével mindössze két darab SNP-t találtunk. A KM Agro 2-es és 12-es egyedében a 107. pozícióban és a Kanadai 4-es és 9-es egyedében a 167. pozícióban találtunk egy bázispáryi eltérést. A Kanadaiban talált pontmutációt az RY-ban is megtaláltuk.

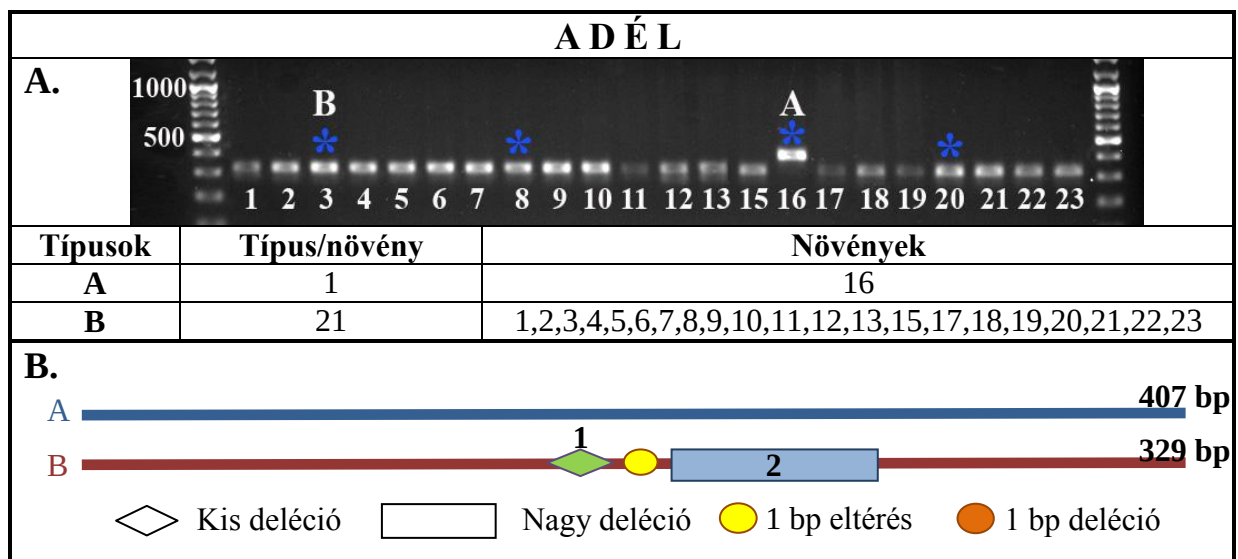
4.3 *accD* gént kódoló régió

4.3.1 *Adél*

A megvizsgált 22 egyedből hossz polimorfizmus alapján 2 típust tudtunk elkülöníteni. (14/A. táblázat) Az A típusba mindössze egy egyed sorolható, míg a többi a B típusba tartozik.

Szekvencia analízissel kiderült 2 típust különítettünk el. Kiderült, hogy a típus eltérését deléciók okozzák. (14/B. táblázat) Az A típushoz viszonyítva, a B típusban a 200. pozíciótól egy 6 bp méretű (1) és a 218. pozíciótól egy 72 bp méretű deléció (2) található, ezzel egyidejűleg egy bázispár eltérés is megfigyelhető a 210. pozícióban.

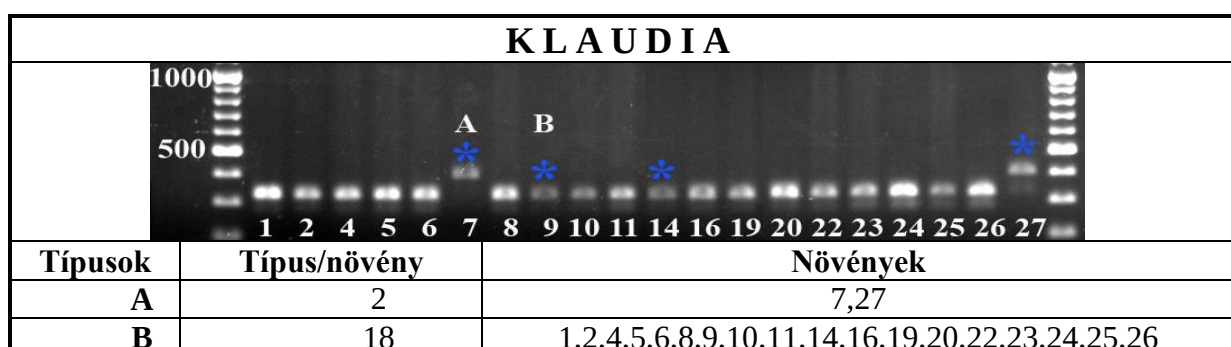
14. táblázat *Adél* hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése



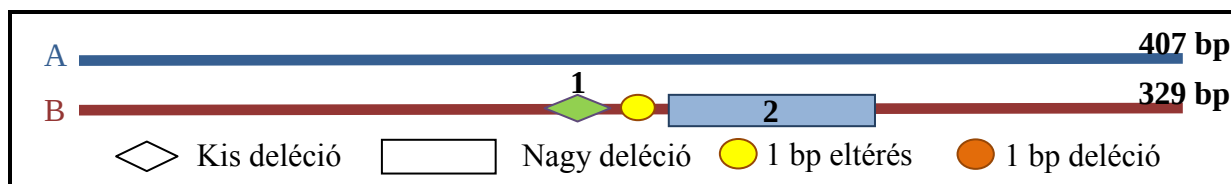
4.3.2 *Klaudia*

A megvizsgált 20 egyedből gélelektroforézissel 2 típust különítettünk el hossz polimorfizmus alapján. (15. táblázat) Az A típusba 1, a B típusba 18 egyed tartozik.

15. táblázat *Klaudia* hossz polimorfizmus vizsgálatának eredménye



Szekvencia analízissel a vizsgált egyedeket 2 típusba osztottuk. (1. ábra) Az A típus szekvenciájához hasonlítva a B típus szekvenciájában a 200. pozíciótól egy 6 bp méretű kis deléció (1) és a 218. pozíciótól egy 72 bp méretű deléció (2) található, ezzel egyidejűleg egy bázispár eltérés is megfigyelhető a 210. pozícióban.



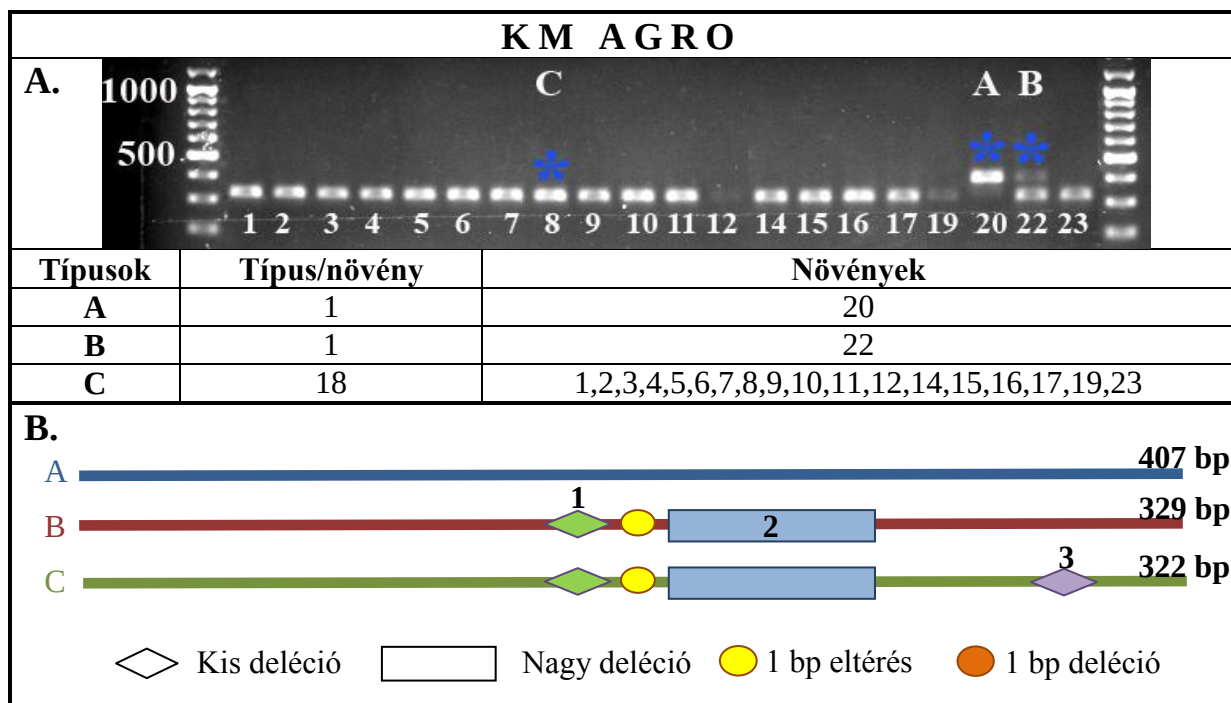
1. ábra Klaudia szekvencia analízisének grafikus szemléltetése

4.3.3 KM Agro

A 20 megvizsgált növényből hossz polimorfizmus alapján 3 típus tudunk elkülöníteni. (16/A. táblázat) Az A és a B típusba egy-egy egyed tartozik, míg a legtöbb egyed (18 darab) a C típusba sorolható.

A szekvenálást követően 3 típust különítettünk el. (16/B. táblázat) Az A típustól a B és C típus is eltér egy bázisban (210. pozícióban) és a 200. pozíciótól egy 6 bp méretű kisebb illetve a 218. pozíciótól egy 72 bp méretű nagyobb delécióban. Ezeken felül a C típusban még található a 366. pozíciótól egy 7 bp méretű deléció (3) is.

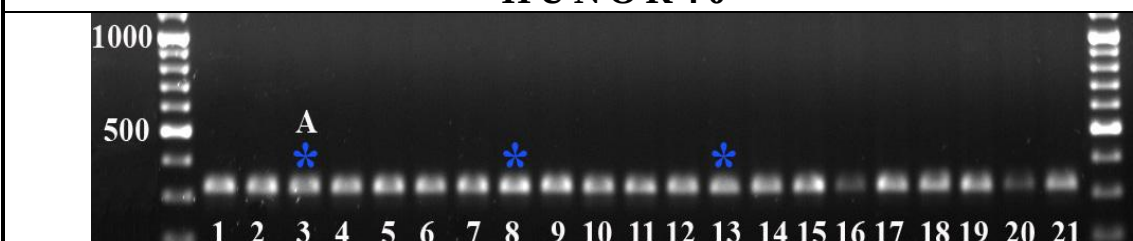
16. táblázat KM Agro hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése



4.3.4 Hunor40

A megvizsgált 21 egyed között nem találtunk hossz polimorfizmust, így mindegyik egyedet az A típusba soroltuk. (17. táblázat) Szekvenálással sem találtunk az egyedek között semmilyen különbséget. A szekvenciák mérete 329 bp volt.

17. táblázat Hunor40 hossz polimorfizmus vizsgálatának eredménye

HUNOR40																					
																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Típusok	Típus/növény		Növények																		
A	21		1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21																		

4.3.5 Solar

A megvizsgált 22 egyed között nem találtunk hossz polimorfizmust gélelektroforézissel, ezáltal minden egyed az A típusba tartozik. (18. táblázat) Szekvenálással sem találtunk az egyedek között semmilyen különbséget. A szekvenciák mérete 329 bp volt.

18. táblázat Solar hossz polimorfizmus vizsgálatának eredménye

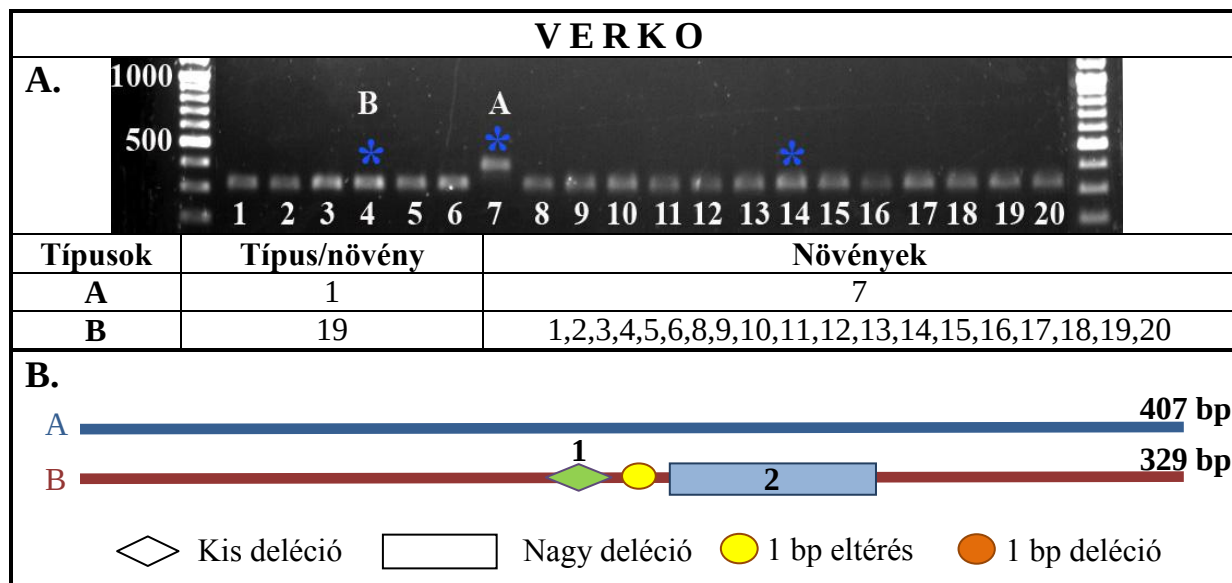
SOLAR																						
																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Típusok	Típus/növény		Növények																			
A	22		1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22																			

4.3.6 Verko

A megvizsgált 20 egyedből 2 típust tudtunk elkülöníteni hossz polimorfizmus alapján. (19/A. táblázat) Az A típus egy növény, a többi 19 egyed B típusba tartozik.

Szekvenálás alapján az egyedek ugyancsak 2 típusba soroltuk. (19/B. táblázat) Az A típus szekvenciájához hasonlítva a B típus szekvenciájában a 200. pozíciótól egy 6 bp méretű kis deléció (1) és a 218. pozíciótól egy 72 bp méretű deléció (2) található, ezzel egyidejűleg egy bázispár eltérés is megfigyelhető a 210. pozícióban.

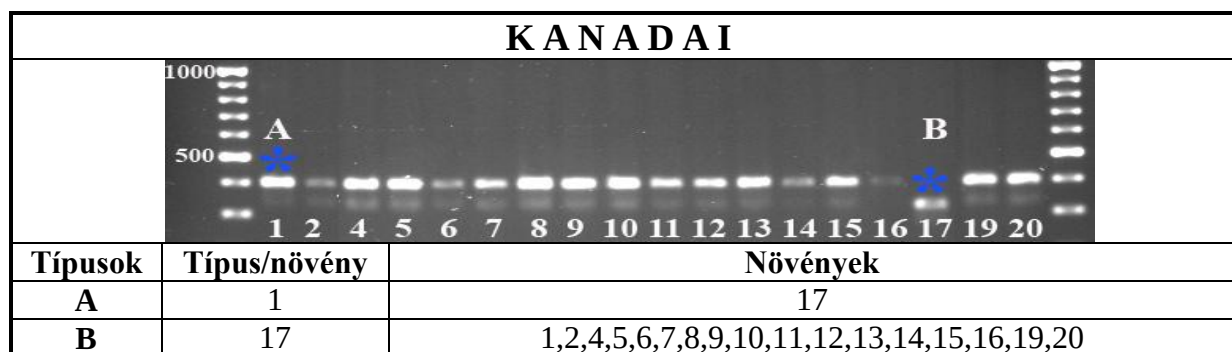
19. táblázat Verko hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése



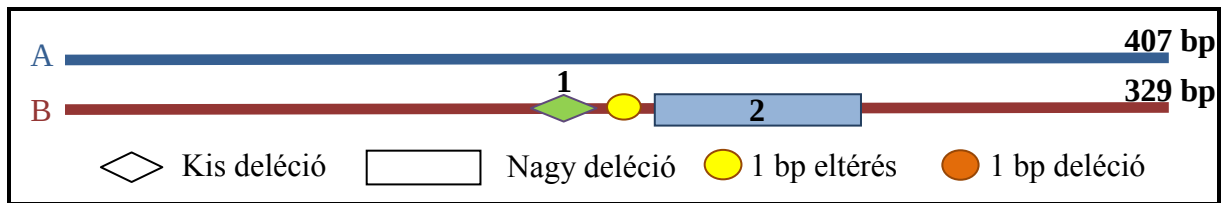
4.3.7 Kanadai

A megvizsgált 20 egyednél hossz polimorfizmus vizsgálattal 2 típust találtunk. A B típusba 19 egyed és az A típusba egy egyed tartozik. (20. táblázat)

20. táblázat Kanadai hossz polimorfizmus vizsgálatának eredménye



Szekvencia analízissal a vizsgált egyedeket 2 típusba tudtuk sorolni. Az A típus szekvenciájához hasonlítva a B típus szekvenciájában a egy 6 bp méretű kis deléció (1) és a egy 72 bp méretű deléció (2) található, ezzel egyidejűleg egy bázispár eltérés is megfigyelhető a 210. pozícióban. (2. ábra)



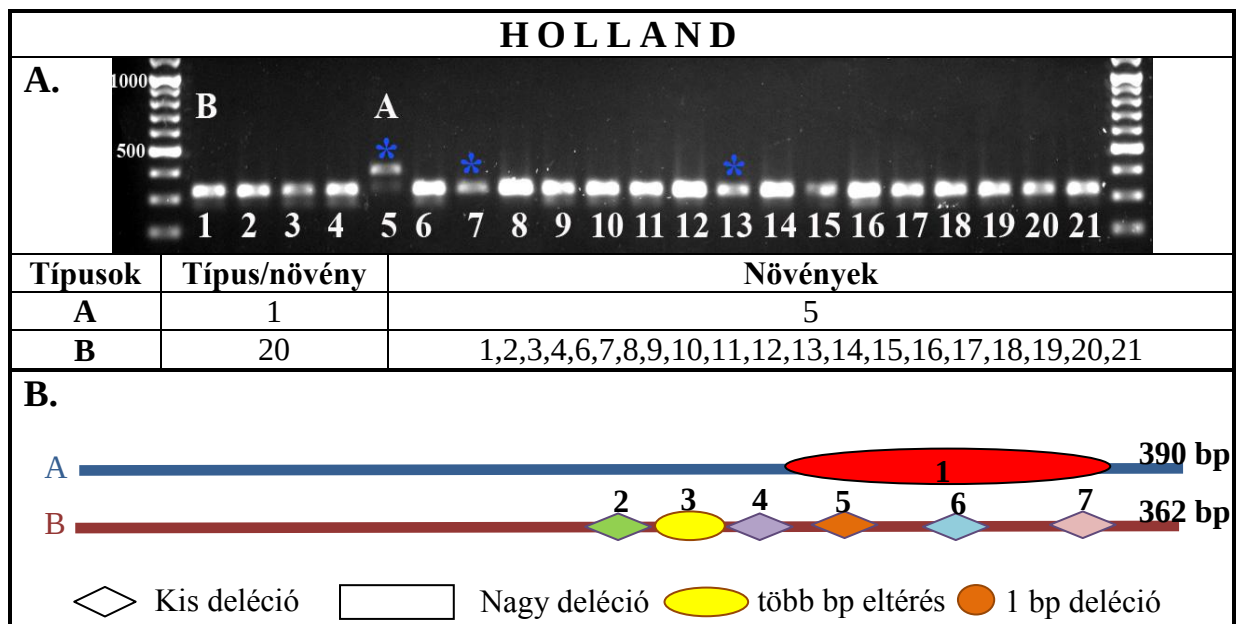
2. ábra Kanadai szekvencia analízisének grafikus szemléltetése

4.3.8 Holland

A megvizsgált 21 egyedből hossz polimorfizmus alapján 2 típust különítettünk el. Az A típusba mindössze egy egyed, a B típusba a többi húsz egyed sorolható. (21/A. táblázat)

Szekvenálással 2 típusba csoportosítottuk a megvizsgált mintákat. (21/B. táblázat) Az A típus körülbelül 100 bp méretű szakaszban (1) teljes szekvenciájában elkülönül az B típustól. Az A típushoz viszonyítva a B típusban a szekvencia második felében több kisebb (9-,9-,4-,3-és 3 bp) méretű deléció (2,4,5,6,7) jelenlétét igazoltuk, valamint találtunk egy 40 bp méretű szakaszt (3), mely 4 db egy bázispáros és 1 db három bázispáros eltérést tartalmaz.

21. táblázat Verko hossz polimorfizmus (A) és a szekvencia grafikus (B) szemléltetése



Az *accD* gént kódoló régióban a fajták szekvenciájának összeillesztésével kiderült, hogy a rövidebb méretű szekvenciákban (329 bp) ugyanazok a változások (200. pozíciótól egy 6 bp méretű kis deléció, a 210. pozícióban egy bázispár eltérést és a 218. pozíciótól egy 72 bp méretű nagy deléció) következtek be az Adél 21-, a Klaudia 18-, a KM Agro 19-, a Verko 19-, a Kanadai 17-, a Hunor és a Solar összes egyede esetén. A KM Agro 19 egyedéből, 18 növény az előbb említett változásokon kívül tartalmaz egy 7 bp méretű kis deléciót is tartalmaz a 366. pozíciótól így szekvencia mérete 322 bp csökkent. A fajták összeillesztésével kiderült, hogy nem a Holland 5-ös egyed, hanem a 7-es és a 13-as tér el a többitől azáltal, hogy szekvenciájában néhány deléció és rengeteg bázispár eltérés van. A Holland 5-ös szekvenciája a többitől (407 bp méretűek) egy kisméretű delécióban és egy bázispárban különbözik. A fajták összeillesztett szekvenciájához az RY-t is hozzáillesztve észrevettük, fent említett változásokból csak az első kisméretű deléció tartalmazza és szekvenciájában a többi fajtától eltérően van egy 42 bp méretű inszerció a 137. pozíciótól.

5. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A kloroplasztban található polimorfizmus molekuláris markerként felhasználható a kloroplaszt öröklődésének tanulmányozására, a filogenetikai kapcsolatok kutatására és a kimutatott különbségek felhasználhatóak fajtaazonosításra és a fajtavédelemben is.

Lucerna polimorfizmus vizsgálatára rutinszerűen elsőként az RFLP-t használták (MASOUD et al. 1989, BRUMMER et al. 1991, BADR et al. 1994). Manapság a PCR alapú módszerek kerültek előtérbe. *M. sativa*-nál a RAPD módszert széleskörűen alkalmazzák. (ECHT et al. 1991, KISS et al. 1993, MENGONI et al. 2000, NOEPVARVAR et al. 2008, MOHAMMADZADEH et al. 2011, NAGL et al. 2011). Az AFLP használata is elterjedt, (JULIER et al. 2003, SLEDGE et al. 2005, KEIVANI et al. 2010) polimorfizmus vizsgálaton kívül, kiválóan alkalmas kapcsoltsági térképek készítésére, QTL-ek azonosítására, melyeket a növénynemesítésben, például biotikus és abiotikus rezisztencia kialakításában használhatnak fel. Az SNP-k detektálása nehéz, azonban molekuláris markerként kiválóan alkalmazhatóak, mivel nagy számban és eltérő eloszlásban fordulnak elő a fajták között és fajtán belül is. (AGARWAL 2008, MONDINI et al. 2009) Legelterjedtebb módszer az SSR vagy mikroszatellitek alkalmazása, mely polimorfizmus detektálásra, deléciók, inszerciók kimutatására alkalmas. (DIWAN et al. 2000, MENGONI et al. 2000, SLEDGE et al. 2005, FLAJOULOT et al. 2011). A különféle markerek a genomi DNS vizsgálatán túl, a kloroplaszt genom polimorfizmus vizsgálatára is kiválóan alkalmasak és az eredmények felhasználhatóak filogenetikai kutatásokban és molekuláris markerként, pl. fajtaazonosításra. (PALMER et al. 1985, HOSAKA 1986, REISBERG et al. 1988, MASOUD et al. 1989, JANSEN et al. 1990, BREMER & STRUWE 1992, SPOONER et al. 1993, BADR et al. 1994, GARGANO et al. 2012) A *Medicago sativa* kloroplaszt genomjából hiányzik az egyik IR szekvencia, ezáltal feltehetően a genom stabilitása csökkent és ez okozza a nagymértékű heterogenitást. (PALMER et al. 1987, MILLIGAN et al. 1989, FITTER & ROSE 1993, SASKI et al. 2005)

TDK dolgozatomban három magyarországi nemesítő helyről (Kisvárdai, Szarvas, Kompolt) 2-2 fajtát választottunk, melyekhez kereskedelembe kapható kanadai és holland magkeveréket és kontrollként a laboratóriumokban használt, jó regenerációs képességű RegenSY vonalat hasonlítottunk. Kutatásunk a kloroplaszt genom három különböző régiójára terjedt ki, 2 intergénikus és egy fehérje kódoló régiót vizsgáltunk.

Hossz polimorfizmus alapján elkülönített egyedekben szekvenálással azonosítottuk a szekvenciákban bekövetkező változásokat, melyeket nemcsak az egyedek szintjén hanem a fajták között is vizsgáltuk.

A ***trnI-rpl23* intergénikus régió** nagyfokú hossz polimorfizmust mutatott a magyar fajtákon belül. A kanadai és holland fajták ezektől teljesen eltérnek, azonban erre a régióra nézve ezekben is nagymértékű heterogenitás figyelhető meg az egyedek között. A ***trnE-trnT* intergénikus régió**ban mindössze egy-egy bázispár eltérést találtunk a KM Agro 2-es és 12-es egyedében és a Kanadai 4-

es és 9-es egyedében. Ezek a pontmutációk lehet, hogy több egyedben is megtalálhatók azonban ez további vizsgálatokat igényel. A Kanadaiban lévő pontmutációt az RY vonalban is megtaláltuk. A holland és a kanadai egyedek között sem találtunk eltérést ebben a régióban. Ez a szakasz tehát erősen konzervatív, amelyben nagyon ritkán és kevés változás következik be. Az **accD** gén vizsgált szakaszára nézve az egyedek között kismértékű variabilitást figyeltünk meg. A Hunor40 és a Solar egyedei között nem találtunk hossz polimorfizmust. A többi fajta esetén a kismértékű variabilitás oka ugyanaz a három változás (kis deléció, pontmutáció, nagy deléció). A kanadai fajta szekvenciája a magyar fajtákkal megegyező változásokat tartalmazta. A holland az egyetlen, amely erőteljesen eltért a többitől, szekvenciájában kisebb deléciók és több bázispárt is magába foglaló szubsztitúciók találhatók.

A fajták összehasonlításához a szekvencia analíziseket használtuk fel, melynél figyelembe vettük a bekövetkező változások helyét és típusát. A **trnI-rpl23 intergénikus régióban** a szekvencia változások a 62-316 bp között következtek be a magyar fajtákban (kivéve Klaudia és Solar). A deléciók mérete 6-70 bp méretű. A régiót pozíció alapján, négy deléció jellemzi. A 73-182 pozícióig a Hunor és az Adél nem mutatott polimorfizmust, míg a többi fajtában rövidebb, hosszabb deléciók, pontmutációk fordultak elő. A 183-252 bp között és a 312-379 bázispárig terjedő szakaszban a fajták között nagymértékű variabilitás figyelhető meg a deléciók méretében. A 370-427bázispárig tartó deléció egyedül a kanadai fajtára jellemző és ez a fajta lényegesen különbözik a többitől. A **trnI-rpl23 intergénikus régió** szekvencia analízise igazolta, hogy a nagyfokú polimorfizmus oka a szekvenciákban lévő kisebb és nagyobb deléciók és azok variabilitásának, illetve pontmutációk előfordulásának az együttes hatása. A **trnE-trnT intergénikus régió**nál a fajták közül csak a KM Agro és a kanadai vizsgált egyedeiben találtunk két-két darab egy bázispáros eltérést (SNP). Az **accD gént** kódoló régióban kevés, de jellemző változásokat figyeltünk meg. Az összes fajta egyedeinek zömében ugyanaz a szekvencia változás van, csupán néhány olyan egyedet találtunk, aminek a szekvenciája teljes volt. A KM Agro szinte összes vizsgált egyede tartalmazta változásokat, de legtöbbjükben további deléció is megjelent. A Holland 7-es és a 13-as egyede tért el leginkább a többi fajta egyedétől, mivel szekvenciájában néhány deléció és rengeteg bázispár eltérés is van. Az **accD** kódoló régióban kismértékű, de azonos variabilitást tapasztaltunk, melynek oka lehet, hogy a kódoló régióban egyéb helyen bekövetkező változások esetleg funkcióvesztéssel járhatnak.

Vizsgálataink során találtunk olyan egyedeket, melyek gél képen több fragment jelent meg egy egyeden belül. Feltételezzük, hogy ezek a növények heterozigóták a kloroplasztra nézve, ami a *Medicago sativa* estén előforduló biparentális öröklődésből adódik, amikor az utódba apai és anyai eredetű cpDNS is kerül. Kísérleteink során a Verko fajta több heterozigóta egyedéből fragment izolálást követően szekvenálást végeztünk és arra a következtetésre jutottunk, hogy a fragmentek 2

különböző típusú kloroplasztból származnak, de ennek bizonyításához még több növény vizsgálata szükséges.

DONG et al. (2012) a kloroplaszt 21 régiójának vizsgálata során megállapították, hogy vannak olyan régiók, melyek alkalmasak polimorfizmus vizsgálatra és vannak olyan régiók, melyek nem. Az általunk vizsgált 3 régióból mindössze a ***trnI-rpl23* intergénikus régió** bizonyult alkalmasnak, mivel ebben a CSG1 primerekkel amplifikált régióban igen nagy változatosságot tapasztaltunk. Ez a nagymértékű változatosság arra utal, hogy nem csak a genomban található mutációra hajlamosabb régiók, hanem a kloroplasztban is (DONG et. al 2012)

Összegzésképpen elmondható, hogy az általunk vizsgált három régióból, a *trnE-trnT* intergénikus régió és *accD* kódoló régiója markerek kifejlesztésére nem alkalmas. A *trnI-rpl23* intergénikus régió polimorfizmusait azonban érdemes közvetlenül vagy a szükséges átalakítással molekuláris markerekké fejleszteni.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzésünk a Magyarországon termesztett lucernafajták kloroplaszt genom polimorfizmusának vizsgálata, a fajtákon belüli és a fajták közötti variabilitás elemzése volt.

Három magyarországi nemesítő helyről (Kisvárd, Szarvas, Kompolt) származó 2-2 fajtát választottunk, melyekhez kereskedelembe kapható, étkezési célra árusított holland és kanadai magkeveréket hasonlítottunk és a laboratóriumunkban használ RegenSY vonalat alkalmaztuk kontrollként. A vizsgálat a kloroplaszt genom három különböző régiójára irányult. Fajtánként minimum 15 db egyedből Zenogene növényi DNS tisztító kittel DNS-t izoláltunk, majd a kloroplaszt genom három különböző régiójára (*trnI-rpl23* intergénikus régió, *trnE-trnT* intergénikus régió, *accD* gént kódoló régió) tervezett primerekkel PCR-t készítettünk. A PCR terméket gélelektroforézissel elválasztottuk és a hossz polimorfizmust mutató egyedekben szekvenálással azonosítottuk a DNS szekvenciában bekövetkezett változásokat. A hossz polimorfizmus és szekvencia analízis alapján a különböző egyedeket eltérő típusokba soroltuk, és megvizsgáltuk a fajtán belüli és a fajták közötti variabilitást is.

Hossz polimorfizmus alapján a *trnI-rpl23* intergénikus régió volt a legváltozatosabb, mind a fajtán belül mind a fajták között nagymértékű heterogenitást tapasztaltunk, melynek hátterét szekvencia analízissel bizonyítottuk. A *trnE-trnT* intergénikus régió vizsgálatakor hossz polimorfizmust nem találtunk egyik fajta egyedei között sem, de szekvencia analízissel két SNP-t tudtunk azonosítani. Az *accD* gént kódoló régió vizsgálatakor a fajták egyedei között kismértékű hossz polimorfizmust találtunk, és a szekvencia analízissel kiderült, hogy ugyanazok a változások találhatók meg az egyedek és a fajták többségében is.

Összességében elmondható, hogy a *trnI-rpl23* intergénikus régióban tapasztalt nagyfokú polimorfizmus oka az, hogy a kloroplaszt genomban e régiójában gyakrabban következett be változás, míg a *trnE-trnT* intergénikus régió feltehetően egy igen konzervatív szakasz, ahol alig történt változás. Az *accD* gént kódoló régióban kisebb méretű változásokat találtunk, melynek oka, hogy a fehérjét kódoló gén egyéb helyén bekövetkező változások funkcióvesztést okozhatnak, ezáltal akár letálisak is lehetnek az egyedre nézve. Az eredmények alapján a *trnE-trnT* intergénikus és *accD* gént kódoló régió vizsgálatát nem folytatjuk, mert marker fejlesztésre nem alkalmasak. A *trnI-rpl23* intergénikus régió polimorfizmusából azonban közvetlenül vagy átalakítással molekuláris markerek fejleszthetők és felhasználhatóak kloroplaszt öröklődésének tanulmányozására, a filogenetikai kapcsolatok kutatására és a kimutatott különbségek felhasználhatóak lehetnek akár fajtaazonosításra vagy a fajtavédelemben is.

Jövőbeni terveink között szerepel a *trnI-rpl23* intergénikus régió további vizsgálata nagyobb egyedszámmal, ami lehetővé teszi az eredmények statisztikai kiértékelését. Távlatosabb céljaink

között szerepel az irodalmi adatok alapján más fajoknál polimorfizmus vizsgálatra alkalmas egyéb kloroplaszt régiók vizsgálata lucernában is.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Konzulensemnek, Dudás Brigittának szeretném megköszönni, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez. Köszönöm odaadó segítségét, mellyel folyamatosan figyelemmel kísérte dolgozatom készülését és hálás vagyok nélkülözhetetlen tanácsaiért, mellyel elősegítette szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növénybiotechnológiai Intézet dolgozóinak, Péli Magdolnának, Maszlag Editnek, Iski Gergelynek, Ivanics Milánnak és Kis Andrásnak, akik segítőkészségükkel és hasznos szakmai tanácsaikkal hozzájárultak munkám sikeres elvégzéséhez.

Hálás vagyok Veres Anikónak és a Szent István Egyetem, Genetika és Biotechnológiai Intézet tanárainak, akik hasznos szakmai tanácsokkal, segítették munkámat.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- AGARWAL M., SHRIVASTAVA, N. & PADH, H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27:617-631.
- BIRKY C. W. (2008): Uniparental inheritance of organelle genes. *Current Biology* 18(16):692-695.
- BÓCSA I. (1979): A Lucerna termesztése. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, pp. 330.
- BRUMMER E. C., KOCHERT G. & BOUTON J. H. (1991): RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 83:89-96.
- BREMER B. & STRUWE L. (1992): Phylogeny of the *Rubiaceae* and the *Loganiaceae*: congruence or conflict between morphological and molecular data? *American Journal of Botany* 79(10):1171-1184.
- CHUMLEY T. W., PALMER J. D., MOWER J. P., FOURCADE H. M., CALIE P. J., BOORE J. L. & JANSEN R. K. (2006): The complete genome sequence of *Pelargonium x hortorum*: organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants. *Mol Biol Evol* 23:2175-2190.
- DIWAN N., BOUTON J. H., KOCHERT G. & CREGAN P. B. (2000): Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA marker in diploid and tetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 101:165-172.
- DONG W., LIU J., YU J., WANG L. & ZHOU S. (2012): Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *Plos One* 7(4):1-9.
- ECHE C. S., ERDAHL L. A. & MCCOY T. J. (1991): Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 37:84-87.
- FITTER J. T. & ROSE R. J. (1993): Investigation of chloroplast DNA heteroplasmy in *Medicago sativa* L. using cultured tissue. *Theoretical and Applied Genetics* 86:65-70.
- FLAJOULOT S., RONFORT J., BAUDOUIN P., BARRE P., HUGUET T., HUYGHE C. & JULIER B. (2005): Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor Appl Genet* 111: 1420–1429.
- GARGANO D., SCOTTI N., VEZZI A., BILARDI A., VALLE G., GRILLO S., COZZOLINO S. & CARDI T. (2012): Genome-wide analysis of plastome sequence variation and development of plastidial CAPS marker in common potato and related *Solanum* species. *Genet Resour Crop Evol* 59:419-430.
- GRIFFITHS A. J. F., MILLER J. H., SUZUKI D. T., LEWONTIN R. C. & GELBART W. M. (2000): An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition, W. H. Freeman and Company, New York
- HAJÓSNÉ NOVÁK MÁRTA (2007a): A növénynevelés alapjai. SZIE jegyzet, SZIE Egyetemi Kiadó, Gödöllő, pp. 102.

- HAJÓSNÉ NOVÁK M. (2007b): Kertészeti növények nemesítésének alapjai. SZIE jegyzet, SZIE Egyetemi Kiadó, Gödöllő, pp. 110.
- HANSEN A. K., ESCOBAR L. K., GILBERT L. E. & JANSEN R. K. (2007): Paternal, Maternal, and Biparental Inheritance Of The Chloroplast Genome In *Passiflora* (*Passifloraceae*): Implications For Phylogenetic Studies. *American Journal of Botany* 94(1):42–46.
- HEINZE B. (2007): A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Methods* 3(4):1-7.
- HESZKY L. (2010): A genetikai program tárolása és realizálása. *Agrofórum* 21(9): 59-63.
- HESZKY L., FÉSŰS L. & HORNOK L. (2005): Mezőgazdasági biotechnológia. Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft, Budapest, pp. 366.
- HESZKY L. & Galli Zs. (2008): A genetika alapjai. SZIE Kiadó, Gödöllő, pp. 220.
- HOSAKA K. (1986): Who is the mother of the potato?— restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes. *Theor Appl Genet* 72:606-618.
- IZSÁKI Z. (2004): Szántóföldi növények vetőmagtermesztése és kereskedelme. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 614., <http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tkt/szantofoldi-novenyek/ch10s05.html>
- JANSEN R. K., HOLSINGER K. E., MICHAELS H. J. & PALMER J. D. (1990): Phylogenetic Analysis of Chloroplast DNA Restriction Site Data at Higher Taxonomic Levels: An Example from the *Asteraceae*. *Evolution* 44(8):2089-2105.
- JOHNSON L. B., & PALMER J. D. (1989): Heteroplasmy of chloroplast DNA in *Medicago*. *Plant Molecular Biology* 12:3–11.
- JULIER B., FLAJOULOT S., BARRE P., CARDINET G., SANTONI S., HUGUET T. & HUYGHE C. (2003): Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BioMed Central Plant Biology* 3(9):1-19.
- KEIVANI M., RAMEZANPOUR S. S., SOLTANLOO H., CHOUKAN R., NAGHAVI M. & RANJBAR M. (2010): Genetic diversity assessment of alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations using AFLP markers. *Australian Journal of Crop Science* 4(7):491-497.
- KÉSMÁRKI I. (2005): Takarmánynövények. In: ANTAL J. (szerk.): Növénytermesztéstan 2. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 595., pp. 357-382.
- KÉSMÁRKI I. (2007): A lucernatermesztés technológiai alapjai. *Növényvédelem* 43(5):203-210.
- KIMBALL J. W. (2011): Polymorphism. Kimball's Biology Pages: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/>
- KIRÁLY I. (2007): DNS-anyagcsere. In: LÁNG F. (szerk.): Növényélettan. A növényi anyagcsere II. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 1034., pp. 598-672.

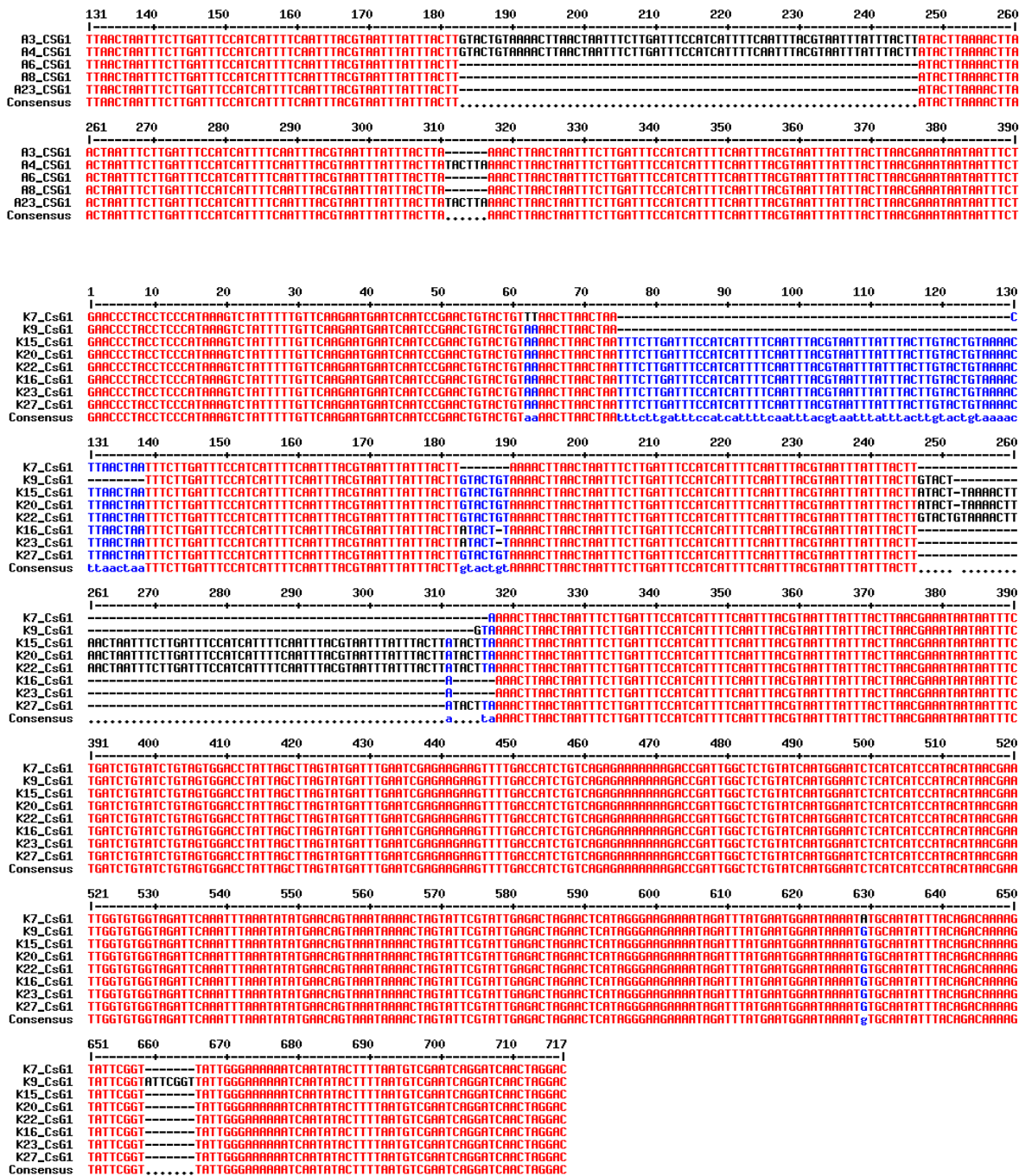
- KISS E. (1999): Növényi molekuláris Genetika I. Egyetemi jegyzet, Gödöllő, pp. 118.
- KISS G. B., CSANADI K. K., KALO P. & OKRESZ L. (1993): Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD isoenzyme and morphological markers. *Mol. Gen. Genet* 238:129-137.
- LEE H. L., JANSEN R. K, CHUMLEY T. V. & KIM K. J. (2007): Gene Relocations within Chloroplast Genomes of *Jasminum* and *Menodora* (*Oleaceae*) Are Due to Multiple, Overlapping Inversions. *Molecular Biology and Evolution* 24(5):1161-1180.
- MARTIN W. (2003): Gene transfer from organelles to the nucleus: Frequent and in big chunks. *PNAS* 100(15):8612-8614.
- MASOUD S. A., JOHNSON L. B. & SORENSEN E. L. (1990): High transmission of paternal plastid DNA in alfalfa plants demonstrated by restriction fragment polymorphic analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 79:49-55.
- MATSUSHIMA R., HU Y., TOYODA K., SODMERGEN & SAKAMOTO W. (2008): The Model Plant *Medicago truncatula* Exhibits Biparental Plastid Inheritance. *Plant and Cell Physiology* 49(1):81-91.
- MILLIGAN B. G., HAMPTON J. N. & PALMER J. D. (1989): Dispersed Repeats and Structural Reorganization in Subclover Chloroplast DNA. *Mol. Biol. Evol.* 6(4):355-368.
- MENGONI A., GORI G. & BAZZICALUPO M. (2000): RAPD and microsatellite (SSR) variation used for assessing genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding* 119:309-315.
- MONDINI L., NOORANI A. & PAGNOTTA M. A. (2009): Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Molecular Diversity Preservation International*, Basel, Switzerland 1:19-35.
- NAGL N., TASKI-AJDUKOVIC K., BARAC G. BABURSKI A., SECCARECCIA I., MILIC D. & KATIC S. (2011): Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. *International Journal of Molecular Sciences* 12:5449-5460.
- PALMER J. D., JORGENSEN R. A. & THOMPSON W. F. (1985): Chloroplast DNA variation and evolution in *Pisum*: patterns of change and phylogenetic analysis. *Genetics* 109:195-213.
- PALMER J., OSORIO B., ALDRICH J. & THOMPSON W. F. (1987): Chloroplast DNA evolution among legumes: Loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Current Genetics* 11:275-286.

- PEPÓ P. (2011): Növénynevelés. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem, pp. 92.
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_07_Novenynemesites/ch16s06.html
- PROVAN, J., POWELL W. & HOLLINGSWORTH P. M. (2001): Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *TREND in Ecology & Evolution* 16(3): 142-147.
- RIESEBERG, L.H., SOLTIS D. E. & PALMER J. D. (1988): A molecular reexamination of introgression between *Helianthus annuus* and *H. Bolanderi* (Compositae). *Evolution* 42(2):227-238.
- RUHLMAN T., LEE S. B., JANSEN R. K., HOSTETLER J. B., TALLON L. J, TOWN C. D. & DANIELL H. (2006): Complete plastid genome sequence of *Daucus carota*: Implications for biotechnology and phylogeny of angiosperms. *BMC Genomics* 7(222):1-13.
- SASKI C., LEE S. B. DANIELL H., WOOD T. C., TOMKINS J., KIM H. G. & JANSEN R. K. (2005): Complete chloroplast genome sequence of *Glycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Molecular Biology* 59:309-322.
- SHAVER J. M., OLDERNBURG D. J. & BENDICH A. J. (2006): Changes in chloroplast DNA during development in tobacco, *Medicago truncatula*, pea, and maize. *Planta* 224:72-82.
- SLEDGE M.K., RAY I.M. & JIANG G. (2005): An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor Appl Genet* 111(5):980-922.
- SMITH S. E. (1989): Influence of parental genotype on plastid inheritance in *Medicago sativa*. *Journal of Heredity* 80:214–217.
- SOBRINO B., BRIONA M. & CARRACEDOA A. (2005): SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154:181-194.
- SPOONER D. M., ANDERSON G. J. & JANSEN R. K. (1993): Chloroplast DNA Evidence for the Interrelationships of Tomatoes, Potatoes and Pepinos (*Solanaceae*). *American Journal of Botany* 80(6):676-688.
- SUNYAEV S., HANKE J., AYDIN A., WIRKNER U., ZASTROW I., REICH J. & BORK P. (1999): Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphism in human disease-associated genes. *Journal of Molecular Medicine* 77 (11):754-760.
- SUTKA J. (2004): Növényi citogenetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 232.
- TOULI L., GUESMI F., FARES K. & FERCHICHI A. (2008a): Genetic Diversity of Some Mediterranean Populations of the Cultivated Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using ISSR Markers. *Biotechnology* 7(4):808-812.
- TOULI L., GUESMI F., FARES K., ZAGROUBA C. & FERCHICHI A. (2008b): Genetic Diversity of Some Mediterranean Populations of the Cultivated Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using SSR Markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(15):1923-1928.

- TUCAK M., POPVI S., UPI T., GRLJU S., BOLARI S. & KOZUMPLIK V. (2008): Genetic diversity of alfalfa (*Medicago spp.*) estimated by molecular markers and morphological characters. *Periodicum Biologorum* 110(3):243-249.
- VARGA J. (1996): Lucerna. In: BOCZ E., KÉSMÁRKI I., KOVÁTS A., RUZSÁNYI L. & SZABÓ M. (szerk.): Szántóföldi növénytermesztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 735-770.
- WAKASUGI T., TSUDZUKI T. & SUGIURA M. (2001): The genomics of land plant chloroplast: gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosynth Res* 70:107-118.
- WOLF A. D. & RANDLE C. P. (2004): Recombination, heteroplasmy, haplotype polymorphism and paralogy in plastid genes: implications for plant molecular systematics. *Systematic Botany* 29(4): 1011–1020.
- ZOSCHKE R., LIERE K. & BORNER T. (2007): From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *Plant J* 50:710-722.
- Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet (2012): Nemzeti fajtajegyzék.
- HTTP1: http://www.pkft.axelero.net/nvt/cikkek/bojsza_lucerna.htm
- HTTP2: Reverse Complement: http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
- HTTP3: Multiple sequence alignment: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- HTTP4: National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

9. MELLÉKLETEK

1. melléklet *trnI-rpl23* intergénikus régió szekvencia analízise fajtánként



45

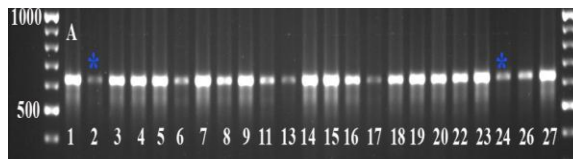
Figure 1 displays a multiple sequence alignment of the 5' region of the 16S rRNA gene from various *Klebsiella pneumoniae* strains. The alignment is presented in blocks of 100 nucleotides, with positions 1 to 780 indicated at the top. The strains included are K16, K17, K20, K9, K8, K1, K2, K3, K4, and K5. Conserved regions are highlighted in black, and variable regions are highlighted in grey. The alignment shows a high degree of conservation across the strains, with only a few nucleotide differences observed in the variable regions.

2. melléklet *trnE-trnT* intergénikus régió hossz polimorfizmusa vizsgálata és szekvencia analízise

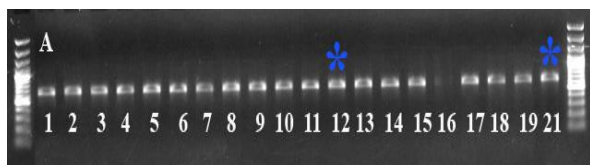
Adél



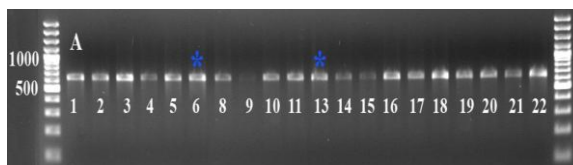
Klaudia



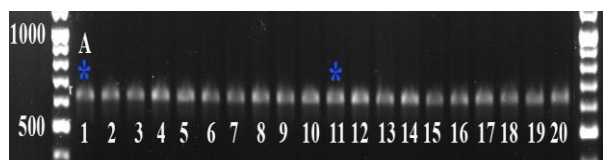
Hunor



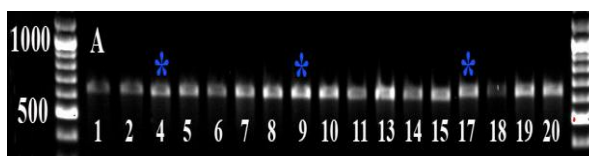
Solar



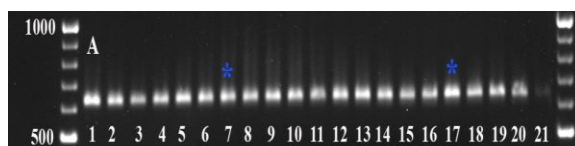
Verko



Kanadai



Solár



	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
A10_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
A1_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
VE1_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
S13_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
S6_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
HL17_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
HL12_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
K24_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
K2_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
KA17_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
VE11_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
H12_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
H21_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
KA4_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
RY_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
KA3_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
KA12_94K	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
Consensus	TGATATGATTCGATCAGAGGATCTTCAGAAATCTCTAAARATCATTTAGATTTTCGAATTTGTCATTCACATCACCARTTTATAAAACTATAAAAAAATATGCGAAGAAACAAAGAGAGAGAG														
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
A10_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
A1_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
VE1_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
S13_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
S6_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
HL17_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
HL12_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
K24_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
K2_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
KA17_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
VE11_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
H12_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
H21_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
KA4_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
RY_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
KA3_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
KA12_94K	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														
Consensus	ATCCTCTTCAGGGAAATGATTGATTTCTGGACAGGTGCGGCATTACACCTCATTCTTCACCTTCATTCAGTGTAGAGAGATTGARTAGTGGGTACATGTATCAATGAATAAATTTTGTGTTAT														

3. melléklet Az *accD* gént kódoló régió szekvencia analízise

The figure displays a series of genomic tracks for human and mouse telomeric repeat sequences. The tracks are organized into three main sections, each with a reference sequence at the top. The sequences are color-coded: A (blue), C (green), G (red), and T (yellow). Gaps are indicated by dashes.

Section 1: 131-250

Reference sequence: `ATATACACGTGTCGAGGACACCCAAATGCGAAARATCATTGGTATCCTTTGTATAGTATTATATACTAGTACTCTCGATTCCACTACTATTTGGACCTTATACATCATATTGCACATATATTCGCA`

Tracks (Human/Mouse):

- HL7_accDR_telJes
- HL13_accDR_telJes
- A16_accD_telJes
- A20_accD_telJes
- VE4_accD_telJes
- S18_accD_telJes
- S3_accD_telJes
- KMR22_accD_telJes
- KMR8_accD_telJes
- K14_accD_telJes
- K9_accD_telJes
- KRI7_accD_telJes
- H3_accD_telJes
- H13_accD_telJes
- H8_accD_telJes
- R3_accD_telJes
- R8_accD_telJes
- KRI1_accD_telJes
- K7_accD_telJes
- VE7_accD_telJes
- KMR20_accD_telJes
- K27_accD_telJes
- HL5_accDR_telJes
- Consensus

Section 2: 261-390

Reference sequence: `CTATCACTATGTCACATCATTTCCGGTCTAAAGTGATACAGCTTTTGGAGCTTAA`

Tracks (Human/Mouse):

- HL7_accDR_telJes
- HL13_accDR_telJes
- A16_accD_telJes
- A20_accD_telJes
- VE4_accD_telJes
- S18_accD_telJes
- S3_accD_telJes
- KMR22_accD_telJes
- KMR8_accD_telJes
- K14_accD_telJes
- K9_accD_telJes
- KRI7_accD_telJes
- H3_accD_telJes
- H13_accD_telJes
- H8_accD_telJes
- R3_accD_telJes
- R8_accD_telJes
- KRI1_accD_telJes
- K7_accD_telJes
- VE7_accD_telJes
- KMR20_accD_telJes
- K27_accD_telJes
- HL5_accDR_telJes
- Consensus

Section 3: 391-450

Reference sequence: `ACTATCATACCGATTTCAGANGC---ATTGGACATCATACCGATTTCAGANGCA`

Tracks (Human/Mouse):

- HL7_accDR_telJes
- HL13_accDR_telJes
- A16_accD_telJes
- A20_accD_telJes
- VE4_accD_telJes
- S18_accD_telJes
- S3_accD_telJes
- KMR22_accD_telJes
- KMR8_accD_telJes
- K14_accD_telJes
- K9_accD_telJes
- KRI7_accD_telJes
- H3_accD_telJes
- H13_accD_telJes
- H8_accD_telJes
- R3_accD_telJes
- R8_accD_telJes
- KRI1_accD_telJes
- K7_accD_telJes
- VE7_accD_telJes
- KMR20_accD_telJes
- K27_accD_telJes
- HL5_accDR_telJes
- Consensus

10. NYILATKOZAT

Alulírott Pesti Réka, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Mezőgazdasági Biotechnológus nappali tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a Tudományos Diákköri dolgozatom saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem.

A szakdolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: nem.

Gödöllő, 2010. október 29.

.....
hallgató aláírása