



A BURGONYA KORAI SÁGÁT BEFOLYÁSOLÓ MOLEKULÁRIS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA

Karsai-Rektenwald Flóra

Doktori (PhD) értekezés

**Gödöllő
2024**

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénygenetika és biotechnológia

vezetője: Dr. Helyes Lajos
főigazgató, egyetemi tanár, MTA tag,
MATE, Szent István Campus
Zöldség- és Gombatermesztési Tanszék

Témavezető: Dr. Bánfalvi Zsófia
csoportvezető, DSc
MATE, Szent István Campus
Genetika és Biotechnológia Intézet
Burgonyakutatás Csoport

Társtémavezető: Dr. Veres Anikó
egyetemi docens
MATE, Szent István Campus
Genetika és Biotechnológia Intézet
Molekuláris Genetika és Nemesítés Csoport

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

.....
Társtémavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
2. BEVEZETÉS	7
3. CÉLKITŰZÉSEK	8
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
4.1. A burgonya eredete és genomja	9
4.2. A burgonya jelentősége	9
4.3. A burgonya növényteni jellemzése	10
4.4. A burgonya élettana és az azt befolyásoló tényezők	10
4.5. A gumófejlődés szabályozása	11
4.5.1. <i>CDF1</i> gén szabályozása és működése	13
4.5.2. <i>GIGANTEA</i> gén szabályozása és működése	15
4.6. CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló genomszerkesztés	17
5. ANYAG ÉS MÓDSZER	20
5.1. Anyagok	20
5.1.1. Burgonyafajta és vonalai	20
5.1.2. Baktérium törzsek	20
5.1.3. Táptalajok	21
5.2. Módszerek	21
5.2.1. <i>In vitro</i> növénynevelés és növény transzformáció	21
5.2.2. Genomi DNS izolálás	22
5.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)	22
5.2.4. Kompetens sejt készítés	23
5.2.5. Klónozás pGEM [®] -T Easy vektorba	23
5.2.6. <i>E. coli</i> transzformáció	23
5.2.7. <i>A. tumefaciens</i> transzformáció	24
5.2.8. Plazmid DNS tisztítás	24
5.2.9. DNS szekvencia analízis	25
5.2.10. <i>GI</i> -promóterek <i>in silico</i> DNS-szekvencia analízise	25

5.2.11. Transzkriptom analízis	25
5.2.12. Génszerkesztésre alkalmas plazmid konstrukciók létrehozása	26
5.2.12.1. gCDF1 konstrukció	26
5.2.12.2. eGI konstrukciók	26
5.2.12.3. mGI konstrukciók.....	26
5.2.13. Üvegházi növénynevelés és morfológiai vizsgálatok	28
5.2.14. Gumóhéj antocián tartalmának meghatározása.....	29
5.2.15. Statisztikai analízis	29
6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE	30
6.1. A <i>CDF1</i> gén jellemzése burgonyában	30
6.1.1. <i>CDF1</i> 'Désirée' mutánsok izolálása és DNS szekvencia szintű jellemzése	30
6.1.2. A <i>CDF1</i> funkció vizsgálata üvegházi körülmények között	32
6.1.2.1. <i>In vitro</i> szaporított növények kiültetéséből származó növények jellemzése... 32	
6.1.2.2. Gumóról szaporított növények jellemzése	36
6.1.3. A gCDF1 mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása.....	40
6.2. <i>GI</i> gének azonosítása burgonyában.....	41
6.2.1. A <i>GI.04</i> promóter elemzése.....	42
6.2.2. <i>Cisz</i> szabályzó elemek a <i>GI.04</i> promóterben	44
6.2.3. A <i>GI.12</i> promóter elemzése.....	46
6.2.4. <i>Cisz</i> szabályzó elemek a <i>GI.12</i> promóterben	48
6.2.5. A <i>GI</i> gének promóter elemzéséből kapott eredmények megvitatása	50
6.3. Az aGI52 levelek transzkriptom elemzése	51
6.3.1. A transzkriptom elemzés eredményeinek megvitatása	57
6.4. Az eGI mutánsok jellemzése	58
6.4.1. Az eGI.04 'Désirée' mutánsok izolálása és DNS szekvencia szintű jellemzése.....	58
6.4.2. Az eGI.04 'Désirée' mutánsok fehérje szintű jellemzése.....	62
6.4.3. A <i>GI.04</i> funkció vizsgálata üvegházi körülmények között	63

6.4.3.1. Az eGI.04 mutáns vonalak gumóhéjának antocián tartalma.....	64
6.4.4. Az eGI.12 'Désirée' mutánsok izolálása és DNS szekvencia szintű jellemzése.....	65
6.4.5. Az eGI.12 'Désirée' mutánsok fehérje szintű elemzése.....	69
6.4.6. A <i>GI.12</i> funkció vizsgálata üvegházi körülmények között	70
6.4.6.1. Az eGI.12 mutáns vonalak gumóhéjának antocián tartalma.....	71
6.5. mGI mutánsok jellemzése	71
6.5.1. mGI mutánsok izolálása	71
6.5.2. Az mGI.12 mutánsok funkció vizsgálata üvegházi körülmények között.....	74
6.6. A GI mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása	76
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	79
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	82
9. ÖSSZEFOGLALÁS.....	83
10. SUMMARY	85
11. MELLÉKLETEK	87
M1. IRODALOMJEGYZÉK	87
M2. A pGEM [®] -T Easy vektor térképe	96
M3. A pCBC-DT1T2 vektor térképe	96
M4. A pKSE401 vektor térképe	97
M5. PCR primerek	98
M6. A <i>GI</i> gének szerkesztésére használt primerek	101
M7. <i>GI.04</i> és <i>GI.12</i> kódoló régiójának szekvenciái	102
M8. <i>GI.04</i> promóter szekvencia	106
M9. <i>GI.12</i> promóter szekvencia	111
M10. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	117
12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	119

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A. tumefaciens: *Agrobacterium*

tumefaciens

ABA: abszicizinsav

Amp₁₀₀: ampicillin 100 mg/l

BEL5: BELLRINGER 1-like 5

CDF1: CYCLING DOF FACTOR 1

Cef₁₀₀: cefotaxim 100 mg/l

CO: CONSTANS

COP1: CONSTITUTIVE

PHOTOMORPHOGENIC 1

CRISPR/Cas9: Clustered Regulatory

Interspaced Short Palindromic

Repeat/CRISPR-associated nuclease 9

DEG: differenciálisan expresszáló gén

Des: ‘Désirée’ burgonyafajta

DOF: DNA binding with One Finger

E. coli: *Escherichia coli*

ELF3: EARLY FLOWERING 3

ET: etilén

FKF1: FLAVIN-BINDING KELCH

REPEAT F-BOX 1 fehérje

FT: FLOWERING LOCUS T

FW: „forward” primer

GI: GIGANTEA

IAA: indol-ecetsav

IPTG: izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid

JA: jázminsav

Km₂₅: kanamicin 25 mg/l

Km₅₀: kanamicin 50 mg/l

LB: Luria broth medium

lncRNS: hosszú nem kódolt („long non-coding”) RNS

LOV domén: Light-Oxygen-Voltage domén

MS: Murashige-Skoog medium

OD: optical density

PCR: polimeráz lánreakció

R: „reverse” primer

rif₁₀₀: rifampicin 100 mg/l

RM: rooting medium

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SP6A: SELF PRUNING 6A

TF: transzkripció faktor

UTR: nem transzlált régió

X-Gal: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid

2. BEVEZETÉS

Napjaink alapvető feladata a klímaváltozás, a termőföldek kimerülése és a kórokozók, kártevők elleni küzdelem. Az egyre növekvő népesség miatt jelentős problémát jelent az élelmiszerhiány. Mindemellett előtérbe került az egészséges táplálkozás is. A vitaminokban, ásványi anyagokban gazdag szántóföldi és zöldségnövények egyre jelentősebb szerepet töltenek be a mindennapi élelmiszerfogyasztásban.

Az egyik legfontosabb termesztett élelmiszernövény a világon, a burgonya (*Solanum tuberosum* L.). Kedvező táplálkozás-élettani tulajdonságokkal bír és értékes ásványi anyagokat, vitaminokat tartalmaz. A FAO szerint, több mint 17 millió hektár volt a burgonya vetésterülete 2022-ben a világon. A burgonya egynyári növény, melyet megvastagodott szárképletéért (gumójáért) termesztünk. Felhasználhatósága sokrétű, az ipari feldolgozásban és az állati takarmányozásban is fontos szerepet tölt be. Ezért a gumó fejlődésének kutatása, mind gazdasági, mind biológiai szempontból meghatározó feladat. Kétféle burgonya típust különböztetünk meg: rövid és hosszú tenyészidejű burgonya fajtákat. A rövid tenyészidejű, korán termő fajták kevésbé vannak kitéve a szélsőséges időjárásnak és a betegségeknek, és mivel rövid idő alatt tudnak termést hozni, a korai fajták gazdasági szempontból is előnyösek. Ezért a burgonyanemesítés egyik fő célja a koraiság növelése.

A növények szaporodási ciklusainak időpontját a környezeti tényezők erősen befolyásolják. A termesztett burgonyafajták őseinek gumófejlődése függ a naphossztól, a rövid nappalos fényviszonyok serkentik, a hosszú nappalok gátolják a gumóképződést. A modern burgonyafajták gumóképzése nem függ a naphossztól, de a hőmérsékletre való érzékenységük megmaradt. Kedvező környezeti feltételek mellett a levélből származó floém-mobil jelek indítják meg a gumófejlődést, majd ezek eljutnak a földalatti módosult szárhoz, a sztólóhoz. A folyamatban három fő szabályozó elem vesz részt: az SP6A, a BEL5 és a CDF1. A CDF1 (CYCLING DOF FACTOR 1) a DOF transzkripciós faktor családba tartozik és az obligát rövid nappalos *S. tuberosum* Andigena tájfajtában a gumófejlődés megindulásának időpontját határozza meg. Kísérleteink egy részének célja az volt, hogy megismerjük a CDF1 szerepét egy naphossztól független gumózású kereskedelmi fajtában, a 'Désirée'-ben.

A gumóképződés szabályozása a burgonyában hasonló az *Arabidopsis* virágzás szabályozásához, amiben a GIGANTEA (GI) is szerepet játszik a *S. tuberosum* Andigena-ban. A GI az FKF1-gyel alkotott komplex részeként részt vesz a CDF1 megkötésében és eljuttatásában a proteaszómákhoz, ahol is a CDF1 lebomlik. Így tehát a GI, közvetett formában, de részt vesz a gumókötés idejének meghatározásában. Kísérleteink másik célja a GI gumókötésben betöltött szerepének megismerése volt a 'Désirée' burgonyafajtában.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja a *CDF1* és a *GI* gének szabályozásának és szerepének megismerése volt egy naphossztól független gumóképzésű, nagy területen termesztett, kereskedelmi burgonyafajtában, a 'Désirée' -ben. Ehhez az alábbi részfeladatok elvégzését terveztük:

- Célzott mutáció létrehozása a 'Désirée' *CDF1* génjében CRISPR/Cas9 rendszer segítségével
 - A *CDF1* mutánsok azonosítása PCR-rel és DNS szekvencia analízissel
 - Három kiválasztott *CDF1* mutáns vonal felszaporítása, majd fenotípusos és gumóképzési jellemzőinek vizsgálata üvegházi körülmények között a nem transzformált 'Désirée' -hez viszonyítva
-
- A *GI* gén(ek) azonosítása 'Désirée' -ben
 - *In silico* predikció a *GI* gén(ek) szabályozására és szerepére
 - Egy *GI* expresszióban gátolt 'Désirée' vonal levelének transzkriptom elemzése
 - Célzott mutáció létrehozása a 'Désirée' *GI* génje(i)ben CRISPR/Cas9 rendszer segítségével
 - A *GI* mutánsok azonosítása PCR-rel és DNS szekvencia analízissel
 - A *GI* mutáns vonalak felszaporítása, majd fenotípusos és gumóképzési jellemzőinek vizsgálata üvegházi körülmények között a nem transzformált 'Désirée' -hez viszonyítva

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A burgonya eredete és genomja

Európa-szerte és hazánkban is, az egyik legfontosabb termesztett élelmiszernövény a burgonya (*Solanum tuberosum* L.). A burgonya a *Solanaceae* családba, azon belül a *Solanum* nemzetségbe tartozik. Közép- és Dél-Amerikából származik az Egyenlítő környékéről, őshazája Peru és Chile (Máté 2010, Radics 1994, Spooner et al. 2007).

A diploid burgonya a vadon élő burgonyafajok mintegy 70%-át teszi ki. A kereskedelmi termelésben azonban az autotetraploid fajták dominálnak, amelyeket vetőgumóval szaporítanak (Tang et al. 2022). A termesztett burgonyafajták erősen heterozigóta, poliszómás tetraploidok ($2n = 4x = 48$), tele ismétlődő részekkel, ami szinte lehetetlenné tette a teljes genom összeállítását. A burgonya genomszekvenciáját a PGSC (International Potato Genome Sequencing Consortium) tette közvé 2011-ben. Teljes genomszekvencia csak az általunk is használt és a dolgozatban is szereplő diploid *S. tuberosum* Phureja (DM1-3) alfajról van. Emellett csak egyes régiók génszekvenciái ismertek, mint pl. a keszthelyi White Lady burgonyafajta egy extrém vírusrezisztencia régiójának DNS szekvenciája (Kondrák et al. 2020).

4.2. A burgonya jelentősége

A burgonya kedvező táplálkozás-élettani jellemzőkkel bír, könnyen emészthető és értékes ásványi anyagokat tartalmaz. Gazdag keményítőben, aminek mennyisége 14-18% között változik, és ami függ a fajtától és a környezeti tényezőktől (Radics 1994). Alacsony, átlagosan 2%-os fehérjetartalma van, azonban ezek a fehérjék biológiailag értékesek. Jelentős vitamintartalommal is bír (200 mg/kg C vitamin, B1-, B2-, K-vitamin, kalcium; Hoffmann 2011, Radics 1994, <https://cipotato.org/>).

A világ élelmiszer-ellátásában a gyökérgumós és más gumós növények jelentős részt képviselnek. A burgonya gazdasági jelentőségét fokozza, hogy jó alkalmazkodóképessége miatt szinte mindenütt termeszthető (Natarajan et al. 2019, Radics 1994). A világon 2022-ben több mint 17 millió hektár volt a burgonya vetésterülete és 210 kg/ha a hozama, míg Magyarországon 2022-ben 8190 hektáron termesztettek burgonyát és 242 kg/ha volt a betakarított mennyiség (<https://www.fao.org/>). A burgonya fogyasztása hazánkban, kedvező élettani hatásai ellenére, visszaesett. Az egy főre jutó évi burgonyafogyasztás folyamatosan csökkent az elmúlt évtizedekben, míg az 1930-as években átlagosan 130 kg volt, az 1970-es években 70 kg-ra, az 1990-es években 60 kg-ra esett vissza, 2022-ben pedig már csak 27 kg volt (Radics 1994, <https://www.ksh.hu/>).

4.3. A burgonya növényteni jellemzése

A burgonya egyéves, lágyszárú növény, amit a földalatti megvastagodott szárképletéért, gumójáért termesztünk. A burgonya föld feletti és alatti hajtásrendszere a gumón fejlődő rügyekből alakul ki. A szár vastagsága, alakja és hossza fajtabélyeg, de a környezeti tényezők erősen befolyásolják (Balázs 1994, Máté 2010). A burgonya levelei összetettek, páratlanul szárnyaltak (Hoffmann 2011). A bogernyős virágzat a hajtásrendszer csúcsán fejlődik, virágai kétivarúak, lila vagy fehér színűek (Radics 1994). A burgonya geofita, ezért kettős szaporodási (szexuális és vegetatív) stratégiát követ (Lehretz et al. 2021). A burgonya termése bogyó, magjait azonban csak nemesítésre használják (Balázs 1994). A föld alatti nódusokból járulékos gyökerek és egy-egy tarackszerű sztóló képződik, melyek végén alakulnak ki a gumók (Máté 2010). A burgonya vegetatív termése a gumó, melynek színe, alakja és sokfajta jellemzője fajtához kötött tulajdonság. Spirálisan helyezkednek el a gumóhéjon a rügy-, illetve csírahajtáskezdemények. Az elültetést követően a gumó csúcsi rügyei kezdenek el először hajtani (Hoffmann 2011, Máté 2010).

4.4. A burgonya élettana és az azt befolyásoló tényezők

Az „A szakasz” a csírázás időszaka, melyben először a csúcsrészen elhelyezkedő „szemek” középső rügyei kezdenek el növekedni és ezzel egy időben kialakulnak az első járulékos gyökerek. A csírázás kezdeti növekedési üteme függ a talajnedvességtől, a hőmérséklettől és a gumó növekedési erélyétől. A „B szakasz” a szár, a levél és a gyökérzet kifejlődési szakasza. A burgonya lomb- és gumó-fejlődés időszaka (85-125 nap) alatt a lombzat és a gyökérzet közel azonos arányban növekszik. Először megjelennek a levelek, majd a szárhajtások. Fontos, hogy ebben a szakaszban kialakuljon az optimális vegetatív lombtömeg. A kelés után nagyjából 2-4 héttel kezdődik meg a gumókötés és ezzel egy időben a bimbózás is kezdetét veszi („C₁ szakasz”). Ez idő alatt fontos a jó víz- és tápanyag-ellátás, de a túlzott nitrogén-ellátás nagy mennyiségű lombfejlődéshez vezethet, ami miatt késhet a gumókötés. A „C₂ szakasz”-ban, a virágzás fenofázisában, éri el a burgonya föld feletti hajtásrendszere a maximumát. Ebben a szakaszban a gumóképzés egyre jobban fokozódik. A gumók végleges számának kialakulása, bár fajtától függően, de általában a bimbózás kezdetétől a virágzás befejezéséig tart. A „D szakasz”-ban a gumók tovább növekednek, de ezzel párhuzamosan a szár és a gyökérzet szárazanyag tartalma csökkenni kezd. A fajta növekedés típusa és a tenyészidő alatt megtermelt szárazanyag mennyisége határozza meg a gumók nagyságát. Rövid és hosszú tenyészidejű növekedési típusok vannak. A rövid típusnál tipikus a visszafogott lombfejlődés és a gyors, korai gumónövekedés, míg a hosszú növekedési típusnál az erős lombzat és a késői gumókötés a jellemző. A termés mennyiségét és nagyságát befolyásolja a lombfelület, a víz- és a tápanyag-ellátás, a fényviszonyok, illetve a hőmérséklet. A fotoszintézis optimális hőmérséklete nappal

20-25°C, éjszaka 10-12°C. Az erős fény növeli a gumófejlődést, de gátolja a levélfejlődést. A hőmérséklet mellett a megvilágítás hossza is befolyásoló tényező és fajtánként eltérő a gumókötés megindulásához szükséges nappalhossz. A rövid nappalos fajtákra a kis levelek a jellemzőek és a gumókötés gyorsan megindul. A hosszú nappalos fajtáknak sok levelük van, és későn kötnek gumót. A virágzás és a gumóképzés időszakában a burgonya nagyon érzékeny a hőmérséklet alakulására. Alacsonyabb (főleg éjszakai) hőmérsékleten gyorsabb a gumókötés, míg a magasabb hőmérsékleten késleltetett. A nappalhossz és a hőmérséklet szerepe lecsökken a gumókötés után. A burgonya vízigénye magas, fajtától függően meghaladhatja a 300 mm-t, így biztonsággal csak öntözés mellett termesztendő. Az „E szakasz” a burgonyaérés (vegetációs időszak 60-70. napjától), ekkor a szár és a levél többsége sárgulni kezd. Az „F szakasz”-ban a vegetatív szervek elpusztulnak, a gumóhéj beparásodik és alkalmassá válik a betakarításra. A „G szakasz” egy átállási szakasz a téli tárolásra, majd a végső „H szakasz”, a gumó nyugalmi szakasza (Hidvégi 2007, Hoffmann 2011, Máté 2010, Radics 1994). A geofiták általában nyugalmi időszakon mennek keresztül, hogy túléljék a hideg vagy aszályos időszakot hagymák, gumók, rizómák formájában (Lehretz et al. 2021).

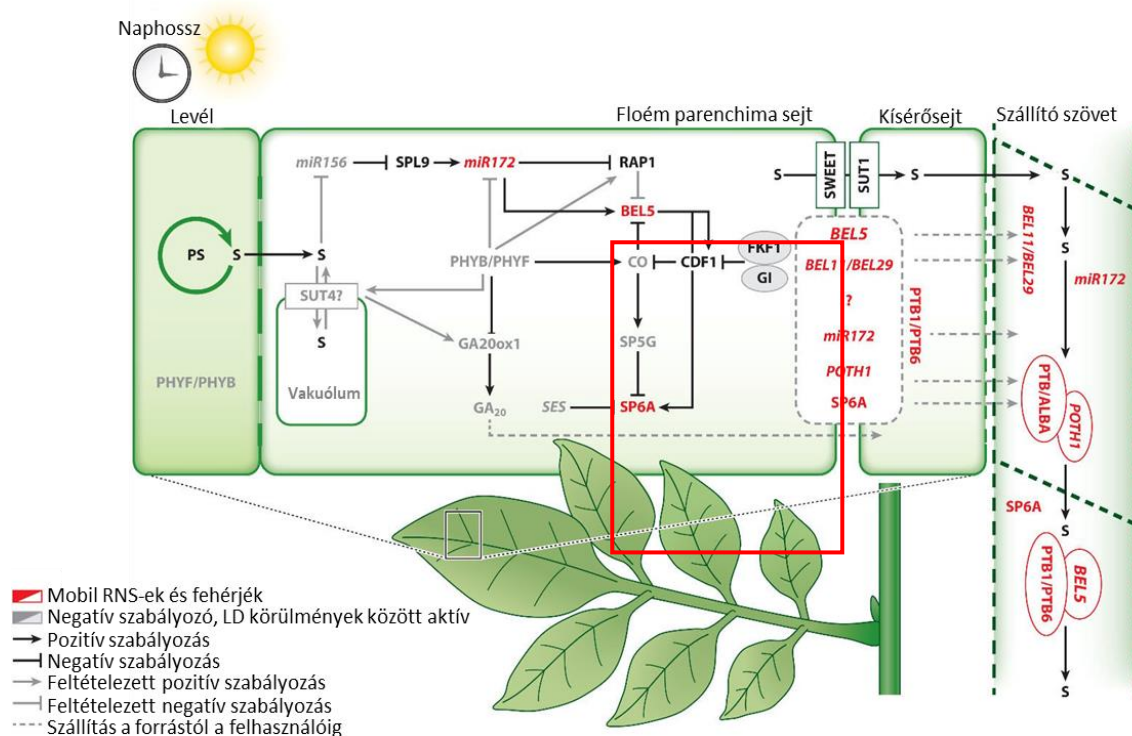
4.5. A gumófejlődés szabályozása

A növények szaporodási ciklusainak időpontját környezeti jelzések határozzák meg, mint pl. a naphossz, a hőmérséklet és az elérhető vízmennyiség (Gonzales et al. 2021). A modern burgonyafajtáknál a gumósodás naphossz-függőségét a háziasítás során ellensúlyozták, bár a hőmérsékletre való érzékenységük megmaradt (Lehretz et al. 2021).

Optimális környezeti feltételek mellett a burgonya gumófejlődését olyan floém-mobil jelek szabályozzák, amelyek a levélből származnak, ezek eljutnak a földalatti módosult szárhoz, a sztólóhoz, és ezzel gumóképződést idéznek elő. A gumók kialakulásának kezdetét három fő szabályozó elem határozza meg: az SP6A (SELF PRUNING 6A), a BEL5 (BELLRINGER 1-like 5) és a CDF1 (CYCLING DOF FACTOR 1) (Banerjee et al. 2006, Hannapel et al. 2017, Kloosterman et al. 2013, Navarro et al. 2011).

A burgonyagumó fejlődésének szabályozása hasonlóságot mutat a virágfejlődés szabályozásával. Az *Arabidopsis thaliana* esetében a virágzást a FLOWERING LOCUS T (FT) nevű peptid hormon, más néven „florigén” expressziója és transzportja indítja el. Az FT ortológjai szabályozzák a virágzást a különböző növényfajokban, pl. a rizsben, paradicsomban és a burgonyában is. Az FT-nek azonban a burgonyában van egy másik homológja is, az SP6A, vagy más néven „tuberigén”, a gumósodás elindításáért felelős mobil szignál, ami a virágzási útvonaltól elkülönülve szabályozódik. Az SP6A expresszióját a naphossz és a hőmérséklet befolyásolja (Kloosterman et al. 2013, Lehretz et al. 2021). Az emelkedett légköri hőmérséklet

elősegíti a hajtások növekedését, a virágzást, miközben gátolja a gumók indukcióját és növekedését. A gumósodás megemelt hőmérséklet általi gátlása párhuzamban áll az *SP6A* expressziójának csökkenésével (Lehretz et al. 2021).



1. ábra: A levélből származó floém-mobil jelek általi gumóindukció szabályozása (Zierer et al. 2021 nyomán). ALBA, ALBA-DOMAIN fehérje; BEL5, BELLRINGER-1 like 5; BELL11, BELLRINGER-1 like 11; BEL29, BELLRINGER-1 like 29; CDF1, CYCLING DOF FACTOR 1; CO, CONSTANS; FKF1, FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F- BOX fehérje; FT, FLOWERING LOCUS T; GA20, GIBBERELLIN 20; GA20ox1, GIBBERELLIN 20-oxidáz 1; GI, GIGANTEA; LD, hosszú nappalos körülmény; PHYB, PHYTOCHROME B; PHYF, PHYTOCHROME F; POTH1, POTATO-HOMEBOX 1; PS, fotoszintézis; PTB1, POLYPYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN 1; PTB6, POLYPYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN 6; RAP1, RELATED TO APETALA2 1; S, szacharóz; SD, rövid nappalos körülmény; SES, SUPPRESSING EXPRESSION OF SP6A; SP5G, SELF PRUNING 5G; SP6A, SELF PRUNING 6A; SPL9, SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE 9; SUT1, SUCROSE TRANSPORTER 1; SUT4, SUCROSE TRANSPORTER 4; SWEET, SUGARS WILL EVENTUALLY BE EXPORTED; Piros négyzettel a központi szerepet játszó gének vannak kiemelve.

A gumófejlődés szabályozásának fontosabb elemeit a rövid nappalos gumózású *S. tuberosum* Andigena tájfajtával végzett kísérletek alapján az 1. ábra mutatja. Az *SP6A*

expresszióját negatívan szabályozza a CO, ami transzkripciósan aktiválja az SP6A antagonista SP5G-t nem-induktív, hosszú nappalos körülmények között. Ilyen körülmények között a CO fehérjét a PHYB és a PHYF stabilizálja, míg a CO transzkripció a CDF1 proteolitikus lebomlásával fokozódik, amit az FKF1/GI komplex közvetít. Rövid nappalos körülmények között a CDF1 elkerüli az FKF1/GI komplex közvetítette lebomlást, ezáltal gátolja a CO expressziót és közvetetten aktiválja az SP6A-t. Az SP6A transzkriptum abundanciáját a SES kis-RNS felügyeli. Mind az SP6A-t, mind a CDF1-et transzkripciósan aktiválja a BEL5, ami a POTH1-gyel kölcsönhatásban működik. A BEL5 felhalmozódását a miR172 és a PHYB szabályozza. A BEL5, POTH1, BEL11, BEL29 és a miR172 floém-mobil mRNS-ek. A BEL5 és a POTH1 mRNS transzportját a PTB1/PTB6 és az ALBA RNS-kötő fehérjék segítik (Zierer et al. 2021).

A szacharóz a fotoasszimilátumok elsődleges szállítási formája, ami nemcsak szubsztrátként szolgál a növekedéshez és a keményítő termeléshez a fejlődő gumóban, hanem jelzi a megfelelő forráskapacitást is. Ez a jel a miR156/SPL modulon keresztül integrálható a fotoperiodikus útvonalba. Az olyan cukorszállítók, mint a SWEET, SUT1, SUT4 szabályozzák a szacharóz elérhetőségét, de ezenkívül valószínű, hogy a GA20 mozgását is aktiválják. A promóterek riportergénes vizsgálatai alapján az útvonal számos szereplőjének expressziója a szállítórendszerhez kötött. A pontos szubcelluláris lokalizáció és a kísérősejtekhez való eljutásuk módja azonban még nem ismert, amit a szaggatott vonallal körülvett rész és a kérdőjel jelez az 1. ábrán a floém parenchima sejtek és a kísérősejtek között (Zierer et al. 2021).

4.5.1. CDF1 gén szabályozása és működése

A burgonya genomjában a *CDF1* (*CYCLING DOF FACTOR1*) a DOF transzkripció faktorok családjába tartozik és a gumófejlődés megindulásának időpontját határozza meg. Az 5. kromoszómán található és átírását a BEL5 szabályozza (Kloosterman et al. 2013, Kondhare et al. 2019). Különböző burgonya genotípusokban három allélváltozatát ismerjük. Ezek a *CDF1.1*, a *CDF1.2* és a *CDF1.3*. A *CDF1.1*-et késői érésű burgonyatípusban azonosították és három konzervált domént (I., II., III.) tartalmaz, amelyek a fehérje-fehérje kölcsönhatáshoz szükségesek. A II. domén részt vesz a GI fehérjével való kölcsönhatásban. A *CDF1.2* és a *CDF1.3* variánsokat a korai érésű burgonyatípusban találták, melyekből hiányzik a III. domén, ami döntő hatása a FKF1 kölcsönhatásban (Kondhare et al. 2019). A III. domén elvesztésének oka a *CDF1.2* esetében egy 7 bázispáros inszerció a 3' végén, ami korai stophoz vezet. A *CDF1.3* ugyanezen régiójában egy 325 bázispáros inszerció 22 aminosavval hosszabb fehérjét eredményez úgy, hogy közben megváltoztatja az utolsó 52 aminosavat (Kloosterman et al. 2013). A *CDF1* gén expressziójában is szerepet játszhat a 3' vég. Kimutatták, hogy a *CDF1*

transzlációs start helyétől 3' irányban, 2400 bázispárral kezdődően, a *CDF1* mRNS-sel ellentétes szálon átíródik egy 1203 bázispár hosszúságú, *FLORE*-nak nevezett hosszú nem kódoló RNS („long non-coding” RNS - lncRNS) gén, ami a *CDF1* mRNS-sel komplementer, és mint ilyen, a *CDF1* mRNS lebomlásához vezethet a géncsendesítés mechanizmusa által. Ez a lebomlás főleg a szállítószövetben valószínű, ahol mind a *CDF1* mRNS, mind a komplementer lncRNS jelenlétét kimutatták. Bár az is igaz, hogy a két mRNS mennyiségének csúcspontja a nap két különböző szakára esik, míg a *CDF1* mRNS-ből a sötét periódus végén, addig a *FLORE* lncRNS-ből a sötét periódus elején van a legtöbb (Gonzales et al. 2021).

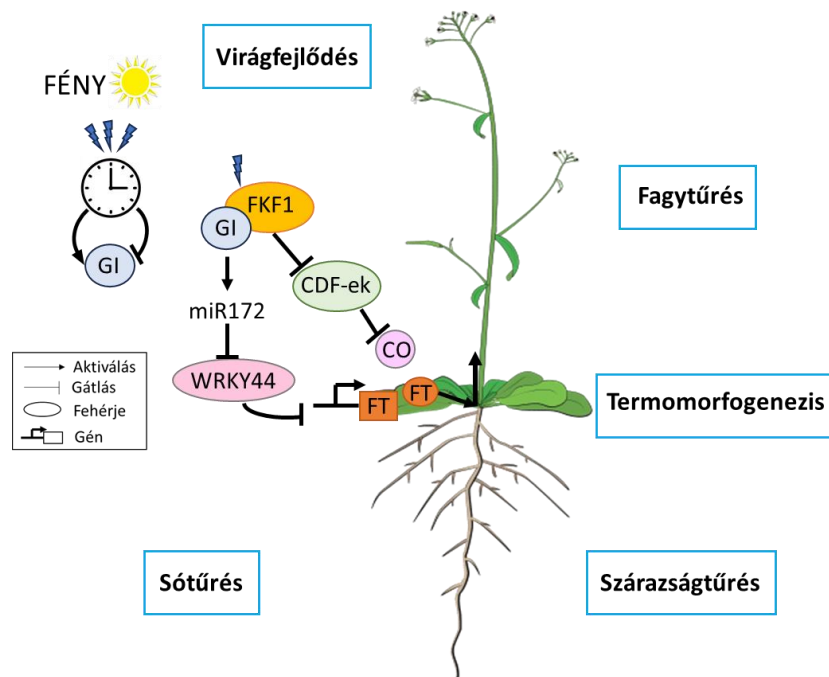
Kimutatták, hogy a levélben átíródó *CDF1* stimulálja a gumóképződést a *COI/2* expressziójának visszaszorításával, ezáltal növelve a gumófejlődés pozitív szabályozójának, az *SP6A*-nak az átírását (Lehretz et al. 2019, Navarro et al. 2011). A *CDF1* központi szabályozóként működik az cirkadián óra jelei (GI és FKF1) és az *SP6A* mobilizációs jel között a levélben, hogy szabályozza a burgonya gumósodását és a növény életciklusát (Navarro et al. 2011, Kloosterman et al. 2013). Ezen kívül kimutatták, hogy a CDF-ek a virágzást is szabályozzák (Sawa et al. 2007, Song et al. 2012). A korai érésű *S. tuberosum* fajtákban előforduló *CDF1* allélok elkerülik a napi ritmus kiváltotta transzlációs ciklust. Azokban a burgonyafajtákban, amelyekben a gumóképződés nem igényel rövid nappalokat, olyan *CDF1* allélok expresszálódnak, melyek a C-terminális régióban módosultak. A cirkadián ritmus szabályozza a GI, az FKF1 és a *CDF1* hármas interakcióját, ami a *CDF1* fehérje lebomlásához vezet. A burgonyában a *CDF1* gén expressziójának szabályozása sokáig ismeretlen volt, de promóter szekvenciáját elemezve, olyan elemeket találtak, amelyek alapján feltételezték, hogy azt egy transzkripciós faktor, a *BEL5* szabályozza (Morris et al. 2014, Kondhare et al. 2019).

A *BEL5*-nek különféle szerepe van. Egyrészt kölcsönhatásba lép a *POTH1*-gyel (egy *KNOX* típusú transzkripciós faktoral), így elnyomja a *GA20-OXIDÁZ 1* transzkripcióját, ami azt eredményezi, hogy a *GA* mennyisége csökken és a citokinin szint emelkedik. Másrészt, indukálja az *SP6A* és a *CDF1* aktivitását, amiknek a promóter régiójában *TGAC* motívumok vannak (Hannapel 2007, Sharma et al. 2016). A *BEL5* és a *CDF1* kölcsönhatás vizsgálatához olyan transzgenikus vonalakat hoztak létre, amelyek vad típusú vagy mutált (hat tandem *TGAC* hely törlése) *CDF1* promótert tartalmaztak a *GUS*-hoz (riporter gén) fuzionálva. Ezzel kimutatták, hogy a tandem *TGAC* motívumok révén a *BEL5* kölcsönhatásba lép a *CDF1* promóterrel, tehát a *CDF1* egy, a *BEL5* által közvetlenül szabályozott gén. A *CDF1* a levél ereiben és a sztóló-gumó átmeneti szakaszban nagyon magas szinten expresszálódik, ami arra utal, hogy a *BEL5-CDF1* modul funkcionális mind a sztólóban, mind pedig a levélben (Morris et al. 2014, Kondhare et al. 2019).

4.5.2. GIGANTEA gén szabályozása és működése

A. thaliana-ban egy „szupervitalis” mutánst azonosítottak 1962-ben, később virágzó fenotípussal és 2,5-3-szor hosszabb életciklussal. A mutáns 25-ször több szárazanyagot és nagyjából tízszer több magot termelt, mint a vad típus. Fenotípusa alapján GIGANTEA-nak (GI) nevezték el (Rédei 1962). A *GI* térképezése során kiderült, hogy a gén 14 exonból áll és egy 1173 aminosavból álló fehérjét kódol (Brandoli et al. 2020a).

A *GI* a növényvilágban mindenhol jelen van és feltételezhető, hogy evolúciója a szárazföldi növények eredetével párhuzamosan ment végbe. A *GI* egy cirkadián óra által szabályozott gén, aminek pleiotróp funkciói vannak. Részt vesz számos folyamatban (2. ábra), mint például a cirkadián ritmus és a virágzási idő szabályozása, hipokotil megnyúlás, klorofill felhalmozódás, vegetatív növekedés, fény-, szacharóz- és hormon jelátvitel, keményítő felhalmozódás, herbicid-, hideg- és szárazságtűrés, transzspiráció, miRNS-feldolgozás és virágillat kibocsátás (Brandoli et al. 2020a, Jose és Bánfalvi 2019, Mishra és Panigrahi 2015).



2. ábra: A *GI* szerepe az *A. thaliana*-ban a virágzás szabályozásában részvevő fehérjékkel és génekkel (Liu et al. 2024 nyomán). *GI*, GIGANTEA; FKF1; FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F- BOX fehérje; CDF, CYCLING DOF FACTOR; CO, CONSTANS; FT, FLOWERING LOCUS T; miR172, mikroRNS 172; WRKY44, WRKY DOMAIN CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 44

A *GI* egy növény-specifikus nukleáris fehérjét kódoló gén, melynek transzkripció csúcspontja 8-10 órával hajnal után van (Mishra és Panigrahi 2015, Park et al. 1999). A

csúcspont időpontját, magasságát és időtartamát a naphossz befolyásolja. A *GI* expressziójának ritmikus mintázata megváltozik az *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* és a *LATE EONGATED HYPCOTYL (LHY)* mutánsokban, illetve a *CIRKADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* túltermelő *Arabidopsis* növényekben (Fowler et al. 1999). A *TIME FOR COFFEE (TIC)* és a *LIGHT-REGULATED WID1* és *WID2 (LWD1 és LWD2)* fehérjék aktivitása szükséges a *GI* transzkripciójának reggeli elnyomásához (Hall et al. 2003, Wu et al. 2008). A *PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR-ek)* szintén részt vesznek a *GI* expressziójának szabályozásában (Nakamichi et al. 2007, Kawamura et al. 2008). A *CCA1* a *GI* promóteréhez kötődve elnyomja a *GI* expresszióját. A *CCA1* motívum szorosan összefügg az úgynevezett *EVENING ELEMENT (EE)* elemmel, ami azon gének promóterében található, amelyek késői napszakban expresszálódnak (Lu et al. 2012). Három *EE*-t és három *ABA RESPONSE ELEMENT LIKE (ABREL)* elemet azonosítottak az *Arabidopsis GI* promóterében, és kimutatták, hogy hozzájárulnak a *GI* transzkripció fényindukálhatóságához (Berns et al. 2014). A *GI* transzkripciójának éjszakai elnyomása az *ELF3*-ból, *ELF4*-ből és *LUX ARRHYTHMO*-ból álló komplexnek tulajdonítható (Helfer et al. 2011, Nusinow et al. 2011). A fény mellett a *GI* expresszióját a hőmérséklet is szabályozza, mivel melegebb hőmérséklet felfelé, a hidegebb hőmérséklet lefelé szabályozza a *GI* transzkriptum szintjét (Paltiel et al. 2006).

Yu és munkatársai (2008) eredményei azt mutatják, hogy a *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)* és az *ELF3* összehangoltan szabályozzák a virágzási időt és a cirkadián ritmust azáltal, hogy modulálják a *GI* biológiai aktivitását. Így a *COP1-ELF3-GI* kölcsönhatás és a *GI* ezt követő gyors éjszakai lebomlása döntő fontosságú lehet a *GI* felhalmozódásának és cirkadián profiljának kialakításában. Ily módon a *COP1* és az *ELF3* szabályozó szerepet játszanak a virágzás kedvező fotoperiódusainak meghatározásában azáltal, hogy megakadályozzák a *CO*-expresszió helytelen időzítését.

A növények növekedését és fejlődését befolyásoló egyik legfontosabb környezeti tényező a fény. A növények legalább három fotoreceptor rendszert fejlesztettek ki a környezeti fényviszonyok hullámhosszának, intenzitásának és időtartamának követésére. Ide tartoznak a vörös/távol-vörös elnyelő fitokrómok, az *UV-A/kék fényreceptorok* és a még nem azonosított *UV-B receptorok* (Huq et al. 2000). A naphossz szezonális változásait a növényi fotoreceptorok érzékelik, felismerik a fényt és továbbítják a fényjeleket a cirkadián óra rendszeréhez, így hozzájárulnak a növény fejlődésének élettani szabályozásához, pl. a hipokotil megnyúláshoz és a virágzáshoz (Kwon et al. 2022, Yu et al. 2008). Az *A. thaliana*-ban a *ZEITLUPE (ZTL)*, *LIGHT-OXYGEN-VOLTAGE (LOV) KELCH PROTEIN 2 (LKP2)* és a *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F BOX (FKF1)* szabályozzák a cirkadián órával és virágzással kapcsolatos

fehérjék specifikus lebomlását a kékfény hatására. A ZTL, LKP2 és az FKF1 általában flavin mononukleotidhoz kötött LOV doménjükön keresztül nyelik el a kékfényt. A kékfény jelző rendszerben a GI közvetlenül kötődik a ZTL, LKP2 és FKF1 fényaktivált LOV doménjéhez. A GI kötődése a ZTL-hez és az LKP2-höz megakadályozza a TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1) és a PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 (PRR5) lebomlását, hozzájárulva a növényi cirkadián óra helyes oszcillációjához, míg a GI-nek az FKF1-hez való kötődése elősegíti a CDF-ek lebomlását és a virágzás megindulását. A GI expresszió fotoperiodikus oszcillációi hozzájárulnak a GI és a ZTL/LKP2/FKF1 közötti kölcsönhatások időzítéséhez (Kwon et al. 2022).

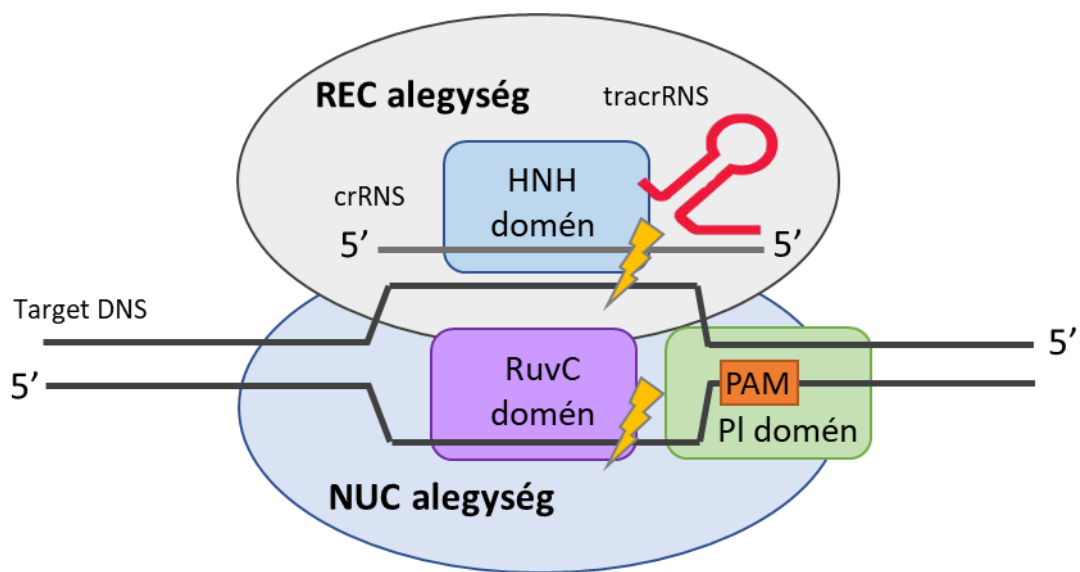
A GI gén a burgonyában is jelen van. A burgonyában a GI nemcsak a virágzásban, hanem a gumóképzés megindításában is részt vesz (Kloosterman et al. 2013). Kimutatták, hogy a *S. tuberosum* Andigena GI expresszióját a levélben a PHYTOCHROME B (PHYB) szabályozza (Rutitzky et al. 2009). Morris és munkatársai (2014) a Neo-Tuberosumban a permisszív gumókezdemény molekuláris alapját vizsgálták az Andigenához történt összehasonlító elemzéssel és tesztelték a GI expresszióját rövid és hosszú nappalos körülmények között. A GI mRNS szintjének napi ciklusos ingadozását mindkét körülmény között, mindkét genotípusban kimutatták, azonban a csúcsok mérete sokkal nagyobb volt az Andigenában, mint a Neo-Tuberosumban. A naphossztól függetlenül a GI expressziója 8 órával hajnal után érte el a csúcsát mindkét burgonya fajtában.

4.6. CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló genomszerkesztés

A CRISPR/Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR-associated nuclease 9; magyarul: rövid, fordított ismétlődésekkel elhatárolt szekvenciák genomi régiója/CRISPR-kapcsolt nukleáz 9) rendszerrel végzett genomszerkesztés a legújabb molekuláris biológiai eszköz, ami célzott mutációk létrehozását teszi lehetővé. A rendszer neve a prokarióták genomjában található rövid, részben ismétlődő DNS-szekvenciák egyedülálló szerveződésére utal. A CRISPR/Cas9 először baktériumokban, majd emlősökben bizonyult hatékonynak, de gyorsan adaptálták a rendszert növényi genomok módosítására is (Asmamaw és Zawdie 2021, Jang és Joung 2019, Vellai és Perczel 2020). A CRISPR/Cas9 rendszert sikeresen alkalmazták több élelmiszernövényben, köztük több *Solanaceae* fajban, pl. paradicsomban és burgonyában is (Wang et al. 2015, Eck 2018, Yamamoto et al. 2018, Bánfalvi et al. 2020).

A CRISPR/Cas9 módszert három fő lépésre lehet felosztani. Az első lépés a rendszer tervezése, felépítése. A második lépésben a létrehozott konstrukciót be kell juttatni a célsejtekbe. A harmadik lépésben az elért hatást kell funkcionális tesztekkel igazolni (Hudacsek és Gyórfy 2018). A CRISPR és a hozzá kapcsolódó Cas9 multidomén-endonukleáz fehérje a prokarióták

adaptív módszere az immunitásuk megőrzése céljából invazív, idegen DNS molekulák (plazmidok) és bakteriofág vírusok ellen. A Cas-fehérjék funkcióik és szerkezetük alapján két osztályba sorolhatók. Az I. osztályba több alegységből álló effektor komplexszel rendelkező rendszerek tartoznak, míg a II. osztályú rendszerek egyetlen Cas9-et használnak. A II. típusú rendszer viszonylag egyszerű, biotechnológiai célokra könnyebben használható és szélesebb körben alkalmazott. A guideRNS (gRNS) és a Cas9 fehérje a rendszer alapvető összetevői. Az első Cas9 fehérjét *Streptococcus pyogenes*-ből vonták ki, ami egy nagy, 1368 aminosavból álló, több doménes DNS-endonukleáz. Ez felelős a cél DNS hasításáért (Asmaw és Zawdie 2021).



3. ábra: A CRISPR/Cas9 vágási mechanizmusa. NUC, nukleáz lebeny; REC, felismerő lebeny; crRNS, CRISPR RNS; tracrRNS, trans-activating CRISPR RNS; HNH domén, endonukleáz domén; RuvC domén, endonukleáz domén; PAM, Protospacer Adjacent Motif, protospacer-rel szomszédos motívum; PI domén, PAM kölcsönható domén (Ishino et al. 2018 nyomán).

A Cas9 REC (recognition) és NUC (nuclease) alegységből áll (3. ábra). A REC alegység a REC1 és REC2 részből tevődik össze. Ezek felelősek a gRNS megkötéséért. A NUC alegység RuvC, HNH és PI doménekből áll. A RuvC és HNH domének a kettősszalú DNS vágására alkalmasak, míg a PI felelős a cél DNS-hez való kötődésért. A gRNS két részből épül fel: a CRISPR RNS-ből (crRNS) és a trans-activating CRISPR RNS-ből (tracrRNS). A Cas9 fehérje egy RNS irányított DNS endonukleáz, ami képes a DNS szekvencia felismerésére és kettéhasítására. A crRNS-sel és a tracrRNS-sel ribonukleoprotein komplexet (RNP-et) képez a Cas9 és a felismert DNS szekvencia mindkét szálát elhasítja. A crRNS első 20 bázispárja („spacer”) felelős a célszekvencia felismeréséért. A spacer szabadon változtatható, az RNP komplex programozható módon képes a különböző DNS szekvenciákat felismerni, majd

hasítani. A DNS szálon a Protospacer Adjacent Motif-nak (PAM-nak) is jelen kell lennie, hogy a célszekvencia felismerhető legyen. Ha a PAM motívum melletti felismert DNS-sel homológ a spacer szekvenciája, akkor a fehérje két nukleáz (RuvC és HNH) doménjével kettős-szálú DNS törést tud létrehozni (Ishino et al. 2018).

A CRISPR/Cas9 genomszerkesztés mechanizmusa általában három lépésre osztható: felismerés, hasítás, javítás. A tervezett single guide RNS (sgRNS) irányítja a Cas9-et, felismeri a célszekvenciát a génben az 5' crRNS komplementer bázispáron keresztül. A crRNS és a tracrRNS fúziójából származó RNS molekula a sgRNS, amit azért hozunk létre, hogy ne kelljen egyenként expresszálni a két összetevőt. A Cas9 fehérje sgRNS hiányában inaktív marad. A Cas9 kettős szálú töréseket hoz létre, melynek helyét az sgRNS jelöli ki (Asmawati és Zawdie 2021, Ceasar et al. 2016, Vellai 2020). Egy három bázispár hosszú szekvencia, a PAM található a cél DNS szakaszon a vágás helyétől 3 bázispárra, ami a vágás hatékonyságához kell. A DNS duplaszálú töréseket ki kell javítani, különben a sejt elpusztulna. Két lehetséges javítás valósulhat meg: homológ rekombináció (HR) vagy az elvágott DNS végek összeragasztása (NHEJ: Non-Homologous End-Joining). A HR pontos javítást eredményez, míg a NHEJ esetében nem mindig pontos a javítás. Ezt azt jelenti, hogy beékelődhet felesleges nukleotid vagy kimaradhat néhány, így inszerciós vagy deléciós mutáns génváltozat jön létre (Hsu et al. 2014, Vellai 2020).

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Anyagok

5.1.1. Burgonyafajta és vonalai

1. táblázat: A kísérletekhez használt burgonyafajta és vonalai

Burgonyafajta	Eredet
<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. 'Désirée'	Fritz Lange KG, Bad Schwartau, Germany
aGI.52	Odgerel et al. (2022)
gCDF1 vonalak	Jelen dolgozat
eGI.04 vonalak	Jelen dolgozat
eGI.12 vonalak	Jelen dolgozat
mGI.04 vonalak	Jelen dolgozat
mGI.12 vonalak	Jelen dolgozat
mGI.4/12 vonalak	Jelen dolgozat

5.1.2. Baktérium törzsek

2. táblázat: A kísérletekhez használt baktérium törzsek

Törzs neve	Genotípus	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F $^-$ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK $^-$, mK $^+$) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	Ach5 (RIF R) Ti pAL4404 (strepr) Octopine	Hoekema et al. (1983)

5.1.3. Táptalajok

LB, SOB és SOC táptalajokat használtunk az *E. coli* és YEB táptalajt használtunk az *A. tumefaciens* törzsekkel végzett munkákhoz, amelyeket Sambrook et al. (1989) alapján készítettünk és antibiotikumokkal egészítettünk ki. Az *Agrobacterium* táptalajhoz 100 mg/ml rifampicint, 25 mg/ml kanamicint, az *E. coli* táptalajhoz 10 mg/ml vagy 25 mg/ml kanamicint vagy 100 mg/ml ampicillint adtunk.

A burgonya szövettenyésztését Murashige-Skoog (MS; Murashige és Skoog 1962) és RM (MS táptalaj vitaminok nélkül) táptalajokon végeztük, amelyek 2% (w/v) szacharózt és 0,8% agart tartalmaztak. A kalluszindukcióhoz CIM (MS táptalaj kiegészítve 1,6% glükózzal, 5 mg/l naftil-ecetsavval (NAA), 2,5 mg/ml benzil-amino-purinnal (BAP), 250 mg/ml cefotaximmal és 50 mg/ml kanamicinnel) táptalajt, a hajtásindukcióhoz SIM (MS táptalaj kiegészítve 1,6% glükózzal, 1 mg/ml zeatin-riboziddal, 5 mg/ml NAA-val, 0,2 mg/ml gibberellinnel, 250 mg/ml cefotaximmal és 50 mg/ml kanamicinnel) táptalajt használtunk (Dietze et al. 1995).

5.2. Módszerek

5.2.1. *In vitro* növénynevelés és növény transzformáció

A burgonyanövényeket *in vitro* 24°C-os fényszobában neveltük, 16/8 óra nappali/éjszakai ciklusban, $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, 40 milliliteres, papírdugóval ellátott kémcsövekben vagy 0,5 literes kupakkal lezárt befőttesüvegekben. A kupakokra egy kis rést fűrtünk, amit egy szivacs darabbal tömtünk be a szellőzés biztosítására. Az apikális hajtással rendelkező növényeket 4 hetente új RM táptalajba helyeztük és szárszegmensekről vegetatív módon szaporítottuk.

Három hétig MS (Murashige és Skoog 1962) táptalajban, befőttesüvegekben nevelt 'Désirée' (1. táblázat) burgonyanövények leveleit Dietze et al. (1995) szerint transzformáltuk. A levélnyel eltávolítása után a leveleket levágtuk, bemetszettük a fonáki részén és 30-40 ml folyékony MS táptalajt tartalmazó Petri-csészébe tettük. A transzformációhoz a konstrukciót tartalmazó *A. tumefaciens* (2. táblázat) törzs szaporítását 28°C-on végeztük 10 ml YEB+Km₂₅ tápfolyadékban egy éjszakán át történő rázatással. A logaritmusos fázisban lévő tenyészetből 2 ml-t kivettünk és Eppendorf csőben 8000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk, majd kétszer 2-2 ml MS tápfolyadékkal mostuk. Utolsó lépésként 1 ml MS tápfolyadékban felszuszpendáltuk a sejteket, amiből 100 μl -t adtunk egy-egy Petri-csészényi levélhez. Két nap sötétben és szobahőmérsékleten tartás után CIM táptalajra helyeztük át a leveleket. Hét nap múlva a CIM táptalajról SIM táptalajra raktuk át a leveleket és a hajtások regenerálódásáig SIM táptalajon tartottuk. A SIM táptalajt hetente frissre cseréltük. A hajtásregeneráció után a hajtásokat antibiotikummal (250 ng/ml Cl + 50 ng/ml Km) kiegészített RM táptalajban gyökerezettük.

5.2.2. Genomi DNS izolálás

A deléciót hordozó mutáns növények megtalálására transzformáció után 8-12 héttel a legyökerezett hajtásokból Shure et al. (1983) módszere alapján genomi DNS-t izoláltunk. Dörzsmozsárban egy *in vitro* növény 4 levelét folyékony nitrogénben elporítottunk, majd körülbelül 100 mg fagyasztott mintára 500 µl DNS izoláló oldatot (2x izoláló puffer: 0,6 M NaCl, 0,1 M Tris-Cl pH 7,5, 40 mM EDTA, 4% Sarcosyl, 1% SDS; 10 M urea; 2 M Na₂S₂O₅) és 500 µl fenol-kloroformot mértünk. A mintát 1 perc vortexeléssel homogenizáltuk, majd 6000 rpm-mel, 4°C-on, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztuk és újabb 500 µl fenol-kloroformot mértünk rá, majd vortexeltük és centrifugáltuk (6000 rpm, 4°C, 10 perc). A centrifugálást követően a felülúszóhoz 330 µl izo-propanolt adtunk, összeforgattuk és 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Következő lépésként 13000 rpm-mel 10 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a csapadékot kétszer 1-1 ml 70%-os etanollal mostuk. Beszárítást követően a csapadékot visszaoldottuk 100 µl TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) pufferben és 1 µl RNase A mastermixben és 37°C-on 30-40 percig inkubáltuk. A DNS kicsapást (-70°C, 1 óra) 300 µl 100%-os etanollal és 5 µl 4 M nátrium-acetáttal végeztük. A kicsapást követően a csapadékot 70%-os etanollal kétszer átmostuk, beszárítottuk és 50 µl desztillált vízben visszaoldottuk. A DNS-eket -20°C-on tároltuk felhasználásig.

5.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-eket 25 µl végtérfogatban készítettük, amelyhez 1 µl 200 ng/µl koncentrációjú DNS-t, 0,5-0,5 µl „forward” és „reverse” primert (50 pg), 0,15 µl DreamTaq DNS polimerázt (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (0,75 U), 2,5 µl DreamTaq puffert és 0,5 µl dNTP keveréket (5 mM) használtunk. A reakciókat Bio-Rad (Hercules, CA, USA) T100 Thermal Cycler vagy Kyratec (Queensland, Australia) SC300 SuperCycler Trinity Thermal Cycler készülékben végeztük.

A reakció körülmények a primerek olvadáspontja és a PCR fragmentumok hosszúságától függően lettek beállítva. Először 95°C-on 5 percig denaturáltuk, majd a reakció elegyet 30-34 ciklusban felszaporítottuk. A ciklust elő-denaturációval kezdtük (95°C 30 másodperc), majd a primertapadás követte, ahol a primerek olvadási hőmérsékletétől függő hőmérsékletet használtunk, hogy a primereket a DNS szálhoz kapcsoljuk. A felszaporítandó fragmentum hosszúságától függően 30-90 másodperc szintézis időt alkalmaztunk. A lánchosszabítás minden esetben 72°C-on 1 percig tartott. A DNS szintézist 72°C, 10 perces elongációval fejeztük be. A PCR-fragmentumokat 1 vagy 1,2%-os etidium-bromidos agaróz gélen futtattuk meg, majd Bio-Rad (Hercules, CA, USA) Gel DocTM EZ Imager-ben fényképeztük le.

5.2.4. Kompetens sejt készítés

LB táplemezre egy telepre szélesztett és növesztett *E. coli* DH5 α baktériumtörzsből (2. táblázat) körülbelül 12 telepet 120 ml SOB folyékony táptalajba oltottunk és 18°C-on 1-1,5 napig 200 rpm-en rázatva Inoue et al. (1990) szerint OD₆₀₀=0,6 értékig növesztettük. De volt, hogy a sejteket csak OD₆₀₀=0,3 értékig növesztettük, mivel a DH5 α törzsből ennél az optikai denzitásnál lehet a legjobban transzformálható sejteket nyerni (Tu et al. 2005). A megfelelő érték elérése után a sejteket 10 percig jégre helyeztük, azután 10 percig 4°C-on Sorwall GSA rotorban 2500 g-vel centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót eltávolítottuk, majd az csapadékhoz 20 ml TB-t (10 mM PIPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) adtunk. Óvatos összekeverés után 10 percig jégen tartottuk, majd 10 percig 4°C-on Sorwall GSA rotorban 2500 g-vel újra centrifugáltuk. A felülúszó ismételt eltávolítása után 4,65 ml TB-en szuszpendáltuk fel a sejteket, amihez azután 0,35 ml dimetil-szulfoxidot adtunk. Végül 100 vagy 200 μ l-enként Eppendorf csövekbe osztottuk szét a sejteket és a csöveket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A kompetens sejteket felhasználásig -70°C-on tároltuk.

5.2.5. Klónozás pGEM[®]-T Easy vektorba

A DNS szekvenciák meghatározásához a DNS fragmentumokat pGEM[®]-T Easy vektorba (Promega, Madison, WI, USA; 2. melléklet) klónoztuk. 10 μ l végtérfogat ligálási elegy a következő elemekből állt: 1. verzió: 5 μ l 2x Rapid Ligation puffer, 1 μ l 50 ng pGEM[®]-T Easy vektor, 1 μ l 3 Weiss unit T4 DNS ligáz és 3 μ l PCR termék; 2. verzió: 5 μ l 2x Rapid Ligation puffer, 1 μ l 50 ng pGEM[®]-T Easy vektor, 1 μ l 3 Weiss unit T4 DNS ligáz és 1 μ l PCR termék, 2 μ l desztillált víz. A ligálást 1 órán át szobahőmérsékleten vagy 4°C-on egy éjszakán át végeztük. A vektorba ligált DNS-t 5.2.6. fejezet alapján transzformáltuk.

5.2.6. *E. coli* transzformáció

A vektorba ligált DNS-t 100 μ l vagy 200 μ l *E. coli* DH5 α kompetens sejthez adtuk, majd 20 percig jégen tartottuk az elegyet. Ezt követően 45-50 másodpercig 42°C-on inkubáltuk, majd 2 percig újra jégre tettük. Ezután 1 ml SOC tápfolyadékot és 20 μ l glükózt (1 M) adtunk hozzá. A baktérium tenyészetet 37°C-os rázógépbbe tettük és 200 rpm-mel 1-1,5 órát ráztattuk.

A pGEM-T[®] Easy rekombináns plazmidokat kék-fehér szelekcióval szelektáltuk ampicillinnel (100 mg/ml), X-Gal-lal (20 mg/ml) és IPTG-vel (100 mM) kiegészített LB táptalajon. A baktériumokat 37°C-on egy éjszakán át növesztettük. A fehér telepeket másnap átoltottuk egy új LB+Amp₁₀₀+X-Gal+IPTG lemezre és egy újabb éjszakán át növesztettük a 37°C-os termosztátban. A feltehetően rekombináns plazmidot hordozó fehér telepekből plazmid DNS-t izoláltunk az 5.2.8 fejezetben leírt módon.

5.2.7. *A. tumefaciens* transzformáció

A pKSE401 plazmid konstrukciókat Höfgen és Willmitzer (1988) szerint jutattuk be *A. tumefaciens*-be. A transzformáláshoz 10 ml folyékony YEB táptalajban rázattuk a baktériumot 28°C-on egy éjszakán át, addig amíg OD₅₄₀-en nem érte el a 0,6 sűrűséget. Ezt követően 2x2 ml-t 8000 rpm-mel 10 percig centrifugáltunk, majd a felülúszót leöntöttük és 1 ml 20 mM CaCl₂ (0°C-ra hűtött) adtunk hozzá. Centrifugáltuk (8000 rpm, 10 perc), a felülúszót leöntöttük és 40 µl 20 mM CaCl₂ (jégen hűtött) és 4 µl (kb. 1 µg) plazmid DNS-t adtunk hozzá. Forgatással óvatosan összekevertük és 5 percig folyékony nitrogénben tartottuk, majd kivettük és 5 percig 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően 4 ml folyékony YEB táptalajt adtunk hozzá és 2-4 órát 28°C-on rázattuk. Ezt követően 8000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük és 100 µl folyékony YEB-et adtunk hozzá, amit azután YEB+Km₂₅ lemezekre szélesztettünk. A felnőtt telepekből plazmid DNS-t izoláltunk (5.2.8. fejezet) és PCR (5.2.3. fejezet) segítségével ellenőriztük őket. Az így kapott *Agrobacterium* törzsekkel burgonyát transzformáltunk az 5.2.1. fejezetben leírtak szerint.

5.2.8. Plazmid DNS tisztítás

A transzformációt követően a bakteriális plazmidok tisztítását Sambrook et al. (1989) módszere alapján végeztük. 1 ml LB tápfolyadékban felnevesztett plazmidot tartalmazó *E. coli* sejteket először 13000 rpm-mel 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót óvatosan eltávolítottuk. 100 µl SOL I (50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl; pH:8, 10 mM EDTA; pH:8) oldatot adtunk hozzá és 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 200 µl frissen összemért SOL II (20 µl 10% SDS, 8 µl 5 M NaOH, 172 µl desztillált víz) oldatot mértünk rá, amit azonnal összekevertünk, majd 5 percig szobahőmérsékleten állni hagyunk. Harmadik lépésként hozzáadtunk 150 µl SOL III (100 ml-ben: 60 ml 5 M kálium-acetát, 11,5 ml jégecet, 28,5 ml desztillált víz) oldatot, összekevertük és 5 percig jégen tartottuk. Öt perc centrifugálást (4°C, 13000 rpm) követően a felülúszót egy új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe mértük át. Ha egy éjszakán át növesztett, stacioner fázisban lévő baktériumokból indultunk ki, akkor a felülúszóhoz 400 µl fenol-kloroformot adtunk, vortexeltük és újra centrifugáltuk (5 perc, 4°C, 13000 rpm) majd a felülúszót újra átpipettáztuk egy Eppendorf csőbe. Logaritmikus fázisban lévő baktériumokból történő plazmid izolálás esetén ezt a tisztítási lépést kihagytuk. Mind a logaritmikus, mind a stacioner fázisban lévő baktérium esetén 1 ml 100%-os etanollal csaptuk ki a felülúszóból, illetve a vizes fázisból a DNS-t. Két perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után, 5 perc centrifugálás (4°C, 13000 rpm) következett. A centrifugálást követően, a felülúszót leöntöttük és a megmaradt csapadékot kétszer 1-1 ml 70%-os etanollal mostuk. A csapadékot beszárítottuk és 50 µl desztillált vízben és 2 µl RNase A mastermixben visszaoldottuk. Az RNase A-val történt RNS emésztést (37°C, 30 perc) követően 2,5 µl 4 M nátrium-acetáttal (pH 5,2) és 150 µl 100%-os etanollal 10 percig jégen

tartva kicsaptuk a plazmid DNS-t. Ezt követően centrifugáltuk (10 perc, 13 000 rpm, 4°C) és a csapadékot kétszer mostuk 1-1 ml 70%-os alkohollal. A csapadékot beszárítottuk és 30 µl desztillált vízben visszaoldottuk. A plazmid DNS-eket –20°C-on tároltuk.

Agrobacterium sejtekből a plazmid DNS-t hasonlóan tisztítottuk, mint *E. coli*-ből, csak a SOL I hozzáadása előtt a sejteket 1 ml 0,1 M NaCl-dal átmostuk.

5.2.9. DNS szekvencia analízis

A DNS szekvenciák meghatározását a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte, a szekvenciák olvasására a BioEdit programot használtuk.

Az NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) és Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programokat használtuk a szekvenciák elemzéséhez. A kapott szekvenciákat a Potato Genomic Resource Spud DB-ben (<http://spuddb.uga.edu/>) található *Solanum tuberosum* group Phureja DM1-3 v6.1 genomszekvenciájához hasonlítottuk.

5.2.10. GI-promóterek *in silico* DNS-szekvencia analízise

A 4. (Soltu.DM.04G027760) és 12. (Soltu.DM.12G007510) kromoszómán található két GI gén promóter régiójának a translációs starthelytől számított 3000 bázispár hosszúságú szekvenciáját a Potato Genomic Resource Spud DB-ből (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/>) nyertük ki, míg az *Arabidopsis thaliana* (AT1G22770.1) GI génjének promóter szekvenciáját a TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) webhelyről töltöttük le. A The Plant Regulation Data and Analysis Platform-ot (PlantRegMap) (<http://plantregmap.gao-lab.org/>) használtuk a transzkripciós faktorok kötőhelyeinek predikciójára.

5.2.11. Transzkriptom analízis

Az RNS-t a transzkriptom analízishez Stiekema és munkatársai (1988) protokollja alapján izolált RNS mintákból 5-7,5 µg RNS-t a Novogene Company Ltd-be (Cambridge, UK) (<https://www.novogene.com/eu-en/>) szállítottunk, ahol minőségi ellenőrzést követően az RNS-eket szekvenáló könyvtárak létrehozására használták fel. Az egyes levélminták három 8-hetes üvegházi körülmények között nőtt növényről származtak. Három minta készült az antiszensz módon gátolt aGI52-es növényekből (*I. táblázat*) és ugyanennyi a nem transzformált 'Désirée' kontrollból. A minták szekvenálása Illumina NovaSeq 6000 platformon történt. A kapott adatokat minőségellenőrzés után a *S. tuberosum* group Phureja DM1–3 v.6.1 referencia genomra (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/dm_v6_1_download.shtml) illesztették.

A bioinformatikai elemzést, mint pl. a koexpressziós Venn diagrammot, a gén ontológiai (GO) és a 'Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes' (KEGG) elemzést szintén a Novogene cég végezte.

5.2.12. Génszerkesztésre alkalmas plazmid konstrukciók létrehozása

5.2.12.1. gCDF1 konstrukció

A *CDF1* gén CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló célzott mutagenézisére a pAGM4723 vektorba (Weber et al. 2011) épített gRNS-eket használtuk. A konstrukciókat Dr. Gyula Péter készítette, létrehozásuk részletes leírása a Karsai-Rektenwald et al. (2023) közleményben található. A kapott rekombináns pAGM4723 plazmidot háromszülős keresztezéssel Ditta et al. (1980) módszere szerint átvittük *E. coli*-ból *A. tumefaciens*-be az *E. coli* (pRK2013) (Figurski et al. 1979) törzset használva helperként. A transzkonjugánsok szelekcióját YEB+Rif₁₀₀+Km₂₅ lemezen végeztük. A 28°C-on felnevesztett telepekből 3 telepet kiválasztottunk, átoltottuk, majd folyékony tápoldatban felnevesztettük őket és plazmid DNS-t izoláltunk belőlük. A plazmid DNS-ekben a *CDF1* mutageniziséhez szükséges inzert jelenlétét *EcoRI* emésztéssel ellenőriztük.

5.2.12.2. eGI konstrukciók

A *GI.04* és *GI.12* gének CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló mutagenéziséhez a gének 3' végéhez közeli („end”) mutációk (eGI.04 és eGI.12 vonalak) létrehozására alkalmas konstrukciókat Dr. Bánfalvi Zsófia készítette azonos módszerrel, mint ahogy a következő részben leírt mGI konstrukciók készültek.

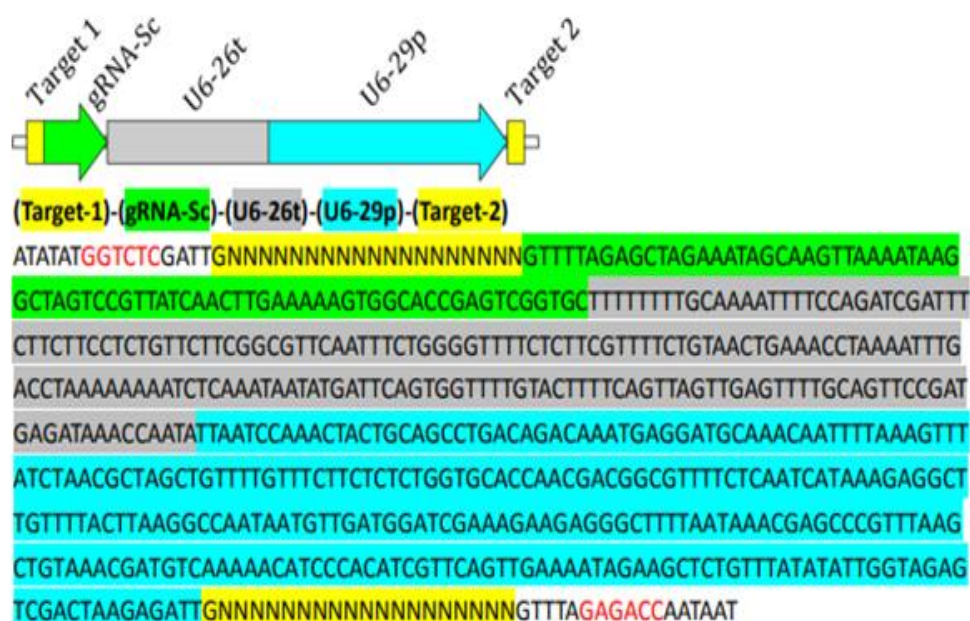
5.2.12.3. mGI konstrukciók

A *GI.04* és *GI.12* gének CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló mutagenéziséhez a gének középső része felé eső („middle”) mutációk (mGI.04 és mGI.12 vonalak) létrehozása Xing et al. (2014) közleménye alapján történt. A gRNS-eket (6. melléklet) a CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) program segítségével terveztük meg. A megszintetizált gRNS oligokat, melyek végükön a pCBC-DT1T2 plazmid (4. ábra) néhány bázisát is tartalmazták, a pCBC-DT1T2 templát DNS (3. melléklet) hozzáadásával Xing et al. (2014) szerint PCR-rel felszaporítottuk, *BsaI* enzimmel hasítottuk, majd ligáltuk a *BsaI* emésztett pKSE401 vektorba (4. melléklet) és *E. coli*-ba transzformáltuk.

A PCR-hez 50 µl végtérfogathoz 5 µl DreamTaq buffert, 1 µl dNTP keveréket (5 mM), 0,5 µl DreamTaq polimerázt (0,75 U), 1 µl pCBC-DT1T2 vektort, 2-2 µl DT1-BsF és DT2-BsR primert (50 pg) (6. melléklet), 1-1 µl DT1-F0 és DT2-R0 primert (50 pg) (6. melléklet) és 36,5 µl desztillált vizet használtunk.

A reakció körülmények a következők voltak: 95°C 5 perc denaturálás, majd 34 cikluson át először 95°C-on 5 perc elő-denaturáció, majd a *GI.04* esetében 65°C-on, a *GI.12* esetében 64°C 1 perc szintézis és a ciklus zárásaként mindkét esetben a lánchosszabítás 1 perc 72°C volt.

A DNS szintézist 10 perces 72°C-on történt elongációval fejeztük be. A PCR sikerességének bizonyítására agaróz gélelektroforézist végeztünk.



Primers:

DT1-BsF: ATATATGGTCTCGATTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTT
DT1-F0: TGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
DT2-R0: AACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAATCTCTAGTCTGACTCTAC
DT2-BsR: ATTATTGGTCTCGAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAA

Template: pCBC-DT1T2

Length: 626-bp

Notes:

1. The 19-nt N in primers represent any 19-nt target sequence (forward primers) or reverse complement sequence of any 19-nt target sequence (reverse primers) in front of PAM (NGG).
2. For the assembly of two gRNA expression cassettes, use DT1-BsF/DT1-F0/DT2-R0/DT2-BsR four-primer mixture with DT1-F0/DT2-R0 diluted to 20 times of DT1-BsF or DT2-BsR, resulting in DT1T2-PCR.

4. ábra: A pCBC-DT1T2 vektor gRNS klónozó részének sematikus rajza és szekvenciája. A célgénre tervezhető gRNS-ek szekvenciáját az „N” betűk jelölik. A piros betűk a *BsaI* enzim felismerőhelyei (Xing et al. 2014 nyomán).

A maradék 45 µl PCR terméket mindkét esetben 135 µl 100%-os etanollal és 2,25 µl 4 M nátrium-acetáttal (pH 5,2) -20°C-on egy éjszakán át kicsaptuk. Másnap 13 000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk, majd a csapadékot kétszer 1-1 ml 70%-os etanollal mostuk. A csapadékot beszárítottuk és 21,5 µl desztillált vízben visszaoldottuk. A PCR fragmentumokat 1 µl *BsaI* (10 U) (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) enzimmal emésztettük 25 µl végtérfogatban,

37°C -on, 1 órán át. Eközben 5 µl pKSE401 (kb. 1 µg) vektort (4. melléklet) is megemésztettünk *BsaI* enzimmel 37°C-on 1 órán át. Emésztést követően 75 µl 100% etanollal és 1,25 µl 4 M nátrium-acetáttal (pH 5,2) kicsaptuk (-20°C egy éjszakán át) az emésztett termékeket. A kicsapást követően centrifugáltuk (13 000 rpm, 10 perc) és a csapadékot kétszer mostuk 70%-os etanollal, majd beszárítottuk. A GI.04-et és GI.12-t 7-7 µl desztillált vízben oldottuk vissza, az emésztett pKSE401 vektorhoz 10 µl desztillált vizet adtunk.

Utolsó lépésként a fragmentumokat *BsaI*-gyel emésztett pKSE401 vektorba klónoztuk. A 10 µl végtérfigatú elegyek a következő elemekből álltak: 1 µl T4 DNS ligáz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 1 µl 10x T4 DNS ligáz buffer, 1 µl emésztett pKSE401 vektor, 7 µl emésztett PCR termék (GI.04 és GI.12 külön-külön). Az elegyeket 4 órán át szobahőmérsékleten tartottuk, majd 200 µl kompetens sejthez (*E. coli* DH5α) adtuk. A transzformációt követően a sejteket LB+Km₂₅ lemezekre szélesztettük és 37°C-os termosztátba helyeztük egy éjszakára. A felnőtt telepeket másnap egy új LB+Km₂₅ lemezekre átolítottuk és egy éjszakán át növesztettük újra 37°C-os termosztátban. Ezt követően mindkét konstrukció 6-6 telepéből plazmid DNS-t tisztítottunk.

A plazmid DNS-ben az inzertek jelenlétét a GI.04 esetében a GI04-393-DT1-BsF és GI04-594-DT2-BsR primer párral (6. melléklet), a GI.12 esetében a GI12-591- DT1-BsF és GI12-799- DT2 BsR primer párral (6. melléklet) ellenőriztük.

5.2.13. Üvegházi növénynevelés és morfológiai vizsgálatok

In vitro körülmények között nőtt 5-7 hetes burgonya növényeket mesterséges táptalajból steril Tabaksubstrat (Stender GmbH, Schermbeck, Németország) földet tartalmazó cserepekbe (1,2 literes, 14 cm-es) ültettük és üvegházi körülmények között neveltük tovább 20-28°C hőmérsékleten. Télen a környezeti fényviszonyok mellett mesterséges megvilágítást is alkalmaztunk 12/12 óra (nappali/éjszakai) ciklusban. A növények optimális növekedési feltételeit a növények heti kétszeri öntözésével biztosítottuk. A növényeket hetente 400 mg/l Mospilan peszticiddel kezeltük.

Üvegházi körülmények között vizsgáltuk a növények magasságát, a levelek morfológiáját (alakját, fejlettségét, hervadását) és a szár vastagságát. A vegetációs időszak elején a fiatal növények gumószámának megismeréséhez a növényeket kiborítottuk a cserépből, majd a számolást követően visszaültettük őket. A vegetációs időszak végén a gumókat begyűjtöttük, majd meghatároztuk tömegüket és darabszámukat. A gumókat sötétben, szobahőmérsékleten tároltuk, és tárolás során vizsgáltuk a csírázás időpontját és mértékét.

5.2.14. Gumóhéj antocián tartalmának meghatározása

Toguri et al. (1993) egyszerűsített módszere alapján végeztük az antocián mérést. Üvegházból frissen betakarított, érett gumók héját lehúztuk, majd 1 g gumóhéjat 10 ml 1%-os metanolos sósavban áztattunk 4°C-on egy éjszakán át. Spektrofotometriásan, abszorbancia mérésével (540 nm) határoztuk meg az antocián pigmentek klorid formáinak kontrollhoz viszonyított relatív mennyiségét.

5.2.15. Statisztikai analízis

Az adatok közötti szignifikáns különbségek kimutatásához a Tukey-próbával kiegészített varianciaanalízist (ANOVA) (<https://astatsa.com/>) alkalmaztuk. A hőtérképek elkészítéséhez a Metaboanalyst 5.0-t (<https://www.metaboanalyst.ca>) használtuk.

6. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

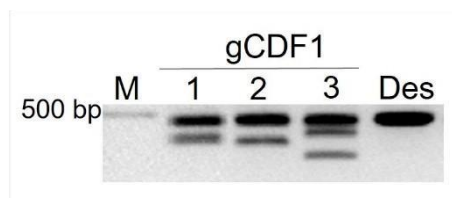
6.1. A *CDF1* gén jellemzése burgonyában

6.1.1. *CDF1* 'Désirée' mutánsok izolálása és DNS szekvencia szintű jellemzése

A *CDF1* gén burgonyában betöltött szerepének megismerésére CRISPR/Cas9 genomszerkesztés segítségével *CDF1* mutánsokat állítottunk elő 'Désirée' burgonyafajtából.

A *CDF1* a *CYCLING DOF FACTOR* transzkripciós családba tartozik, melynek tagjai sok esetben nagy hasonlóságot mutatnak egymással. Emiatt, hogy az ún. „off target” mutációk létrejöttét kiküszöböljük, a *CDF1* 3'-UTR-ére terveztük a gRNS-eket reménykedve abban, hogy olyan nagyméretű deléciókat kapunk, amelyek elérik a *CDF1* 3' kódoló régióját.

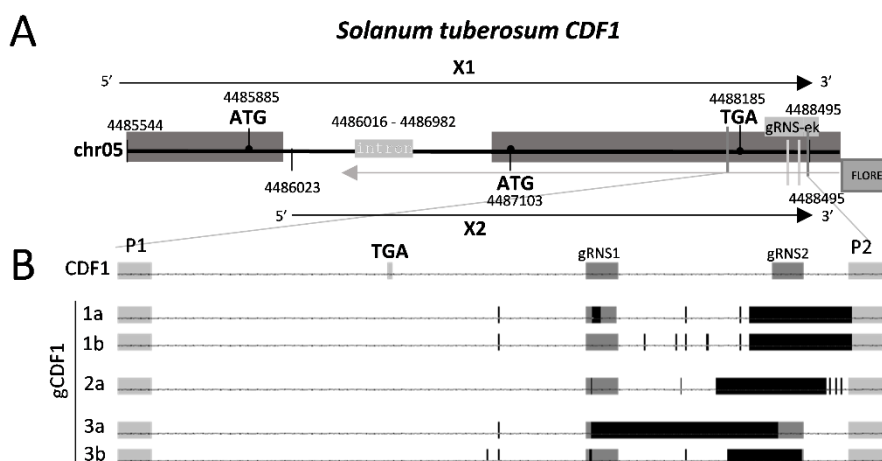
A mutánsok előállítására egy olyan konstrukciót hoztunk létre, ami magában hordozta a Cas9 fehérje kódját és a gRNS-ek kódját (5. melléklet A), majd a konstrukciót 'Désirée'-be juttattuk és szelektív táptalajon regeneráltattuk a transzformánsokat. A mutációk keresésére először genomi DNS-t izoláltunk a legyökerezett hajtásokból és 75 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük *CDF1.1* 3' end FW és R primer párral (5. melléklet B) végzett PCR-rel. Tizenegy olyan mutáns növényt találtunk, amelyekben agaróz gélen is jól látható méretű deléció volt. Az 5. ábra mutatja, mely deléciók alapján választottuk ki azt a három mutáns vonalat, amiket tovább teszteltünk. A továbbiakban g*CDF1*/1, g*CDF1*/2 és g*CDF1*/3 névvel fogunk rájuk hivatkozni.



5. ábra: A g*CDF1* mutánsok azonosítása *CDF1.1* 3' end FW és *CDF1.1* 3' end R primerekkel végzett PCR-rel. M, marker; 1, 2, 3, kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll

A 'Désirée' tetraploid burgonyafajta. Olyan mutáns növényt nem tudtunk azonosítani, amelyik null mutáns lett volna, vagyis nem kaptunk olyat, amiben mind a négy *CDF1* allélban deléció keletkezett volna. Több primert (5. melléklet B) is terveztünk a *CDF1* 3' kódoló régiójára, de PCR-rel nem találtunk olyan mutánst, amiben a deléció elérte volna a kódoló régiót.

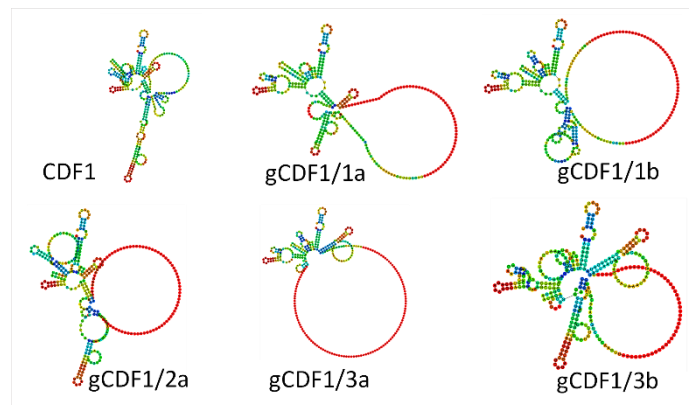
A deléciók méretének és elhelyezkedésének meghatározására a *CDF1.1* 3' end FW és R primerekkel kapott (5. ábra) PCR fragmentumokat klónoztuk a pGEM[®]-T Easy vektorba és a plazmid DNS PCR fragmentumát megszekvenáltattuk. A kapott szekvenciákat a *S. tuberosum* Phureja Spud DB-ben található *CDF1* genomszekvenciához hasonlítottuk (6A ábra).



6. ábra: (A) A *CDF1* gén és transzkriptumainak sematikus rajza. Az *X1* (XM_006355049.2), *X2* (XM_015312183.1) és *FLORE* (Gonzales et al. 2021) transzkriptumokat a nyilak jelzik. A számok a kromoszómán belüli pozíciót jelölik; chr05, V kromoszóma; ATG, translációs start kodon; TGA, translációs stop kodon. (B) A deléciók elhelyezkedése és mérete a 'Désirée' *CDF1* szekvenciájához hasonlítva. A fekete téglalapok jelzik a deléciókat, a vonalak egy-egy bázispár különbségre utalnak. P1, *CDF1.1* 3' end FW primer; P2, *CDF1.1* 3' end R primer; gRNS1, *CDF1.1* gRNA1 „guide” RNS; gRNS2, *CDF1.1* gRNA2 „guide” RNS

A mutáns vonalakban különböző méretű és elhelyezkedésű deléciókat kaptunk. Az *6B ábrán* a g*CDF1* mutáns növényekben kapott deléciók pontos elhelyezkedése látható. Több mutáns vonalban kaptunk egy-egy bázispár különbséget is a Spud DB-ben található *S. tuberosum* Phureja *CDF1* szekvenciájához hasonlítva. A g*CDF1*/1/a vonalban egy 4 és egy 64 bázispáros, a g*CDF1*/1/b-ben egy 64 bázispáros deléciót azonosítottunk. A g*CDF1*/2-ben egy 1, egy 69 és három 1 bázispáros deléciót találtunk. A g*CDF1*/3/a-ban egy 117 bázispáros, a g*CDF1*/3/b-ben egy 2 és egy 47 bázispáros deléciót azonosítottunk.

Az eukarióta mRNS-ek 3' végének egy része nem fordítódik át fehérjévé, de az átírás hatékonyságában meghatározó szerepe van. A 3'-UTR az AAUAAA szekvencia részlet után elhasítódik, ezután poliadenilálódik (Nyitray és Pál 2013). Feltételeztük, hogy a *CDF1* mRNS végszerkezetét a g*CDF1* mutánsokban található deléciók megváltoztatták. Ennek igazolására a CentroidFold program (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) segítségével számítógépes predikciót végeztünk. A számítógépes elemzés igazolta feltételezésünket, hogy a *CDF1* mRNS végszekvenciájának szerkezete nagymértékben különbözik a vad típusú *CDF1* mRNS-ének végszekvenciájától (*7. ábra*).



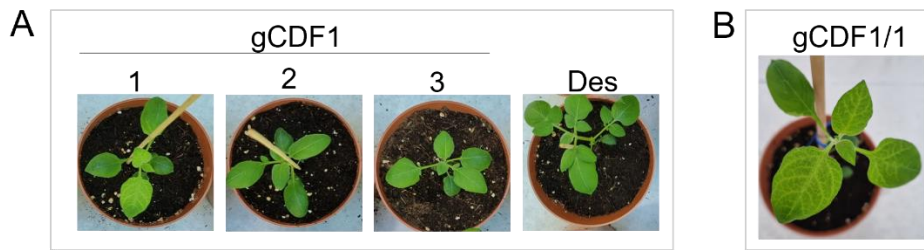
7. ábra: A *S. tuberosum* Phureja és a gCDF1 mutánsok *CDF1* mRNS-ének feltételezett másodlagos szerkezete a transzlációs stop kodontól a poliadenilációs jelig

6.1.2. A *CDF1* funkció vizsgálata üvegházi körülmények között

6.1.2.1. *In vitro* szaporított növények kiültetéséből származó növények jellemzése

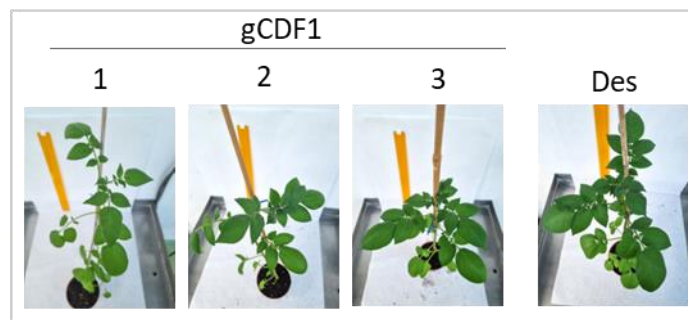
Bár a gCDF1 mutánsok egyikében sem érte el a deléción a kódoló régiót, a gén bonyolult, a 3'-UTR-en is áthaladó, *FLORE*-nak nevezett lncRNS szabályozó funkcióját figyelembe véve (Gonzales et al. 2021 és 6A ábra) kíváncsiak voltunk a növények fenotípusára, illetve gumóképzési tulajdonságaira. Ezekhez a vizsgálatokhoz a három gCDF1 mutáns vonalból 12-12 vegetatívan szaporított 4 hetes egyedeket ültettünk ki steril földdel megtöltött cserepekbe, majd természetes fényviszonyok mellett, üvegházi körülmények között neveltük tovább a növényeket. Kontrollként nem transzformált 'Désirée' növényeket használtunk, amelyekből dupla mennyiséget ültettünk ki.

A gCDF1 mutánsok levélmorfológiája látszódik a vegetációs időszak elején a 8. ábrán. Az összetett levelek fejlődése mind a három gCDF1 mutáns növény esetében késett a 'Désirée' kontrollhoz képest (8A ábra). Emellett a gCDF1/1 növények levélerezete világosabb is volt, mint a többieké (8B ábra).



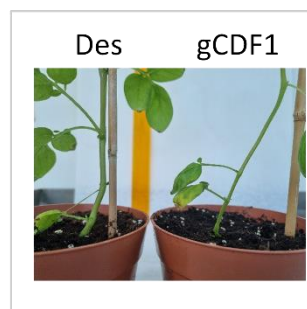
8. ábra: Vegetációs időszak elején a gCDF1 mutáns vonalak levélmorfológiája a kontroll 'Désirée'-hez viszonyítva (A) és a CDF1/1 levélerezete (B)

Ennek ellenére a vegetációs időszak későbbi időszakában, a kontroll növényekhez hasonlóan, a gCDF1 növényeken is összetett levelek alakultak ki (9. ábra).



9. ábra: A gCDF1 mutáns vonalak levélmorfológiája a vegetációs időszak közepén a kontroll 'Désirée'-hez viszonyítva

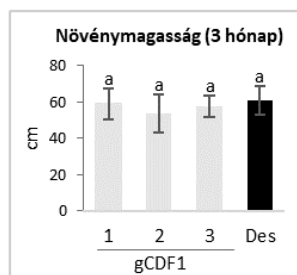
Mind a három gCDF1 mutáns növény szára vékonyabb volt, szártagjaik is megnyúltak a 'Désirée' kontroll növény szártagjaihoz képest (10. ábra).



10. ábra: A gCDF1 mutánsok szárvastagsága a vegetációs időszak közepén a 'Désirée'-hez viszonyítva

A vegetációs időszak közepén lemértük a gCDF1 mutáns vonalak magasságát. A gCDF1/1 növények átlagosan $59 \pm 8,3$, a gCDF1/2 növények $53,6 \pm 10,4$, a gCDF1/3 növények $57,6 \pm 5,8$ cm-esek voltak. A kontroll növények átlagos magassága $60,7 \pm 7,7$ cm volt. A

vegetációs időszak közepén a gCDF1 növények és a kontroll növények magassága között szignifikáns különbség nem volt (11. ábra).

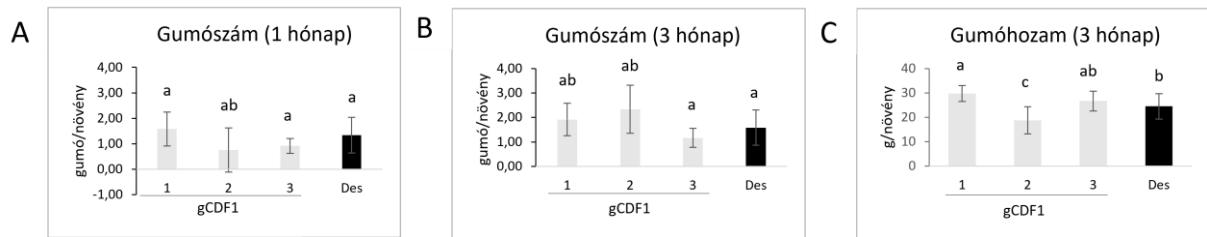


11. ábra: A gCDF1 mutáns vonalak magassága a vegetációs időszak közepén a 'Désirée'-hez viszonyítva

Egy hónapos növények gumóinak megszámlálásával megbecsültük a gumófejlődés koraiságát. Az átlagos gumószámok így alakultak: gCDF1/1 növényeken $1,6 \pm 0,7$, a gCDF1/2 növényeken $0,8 \pm 0,9$, a gCDF1/3 növényeken $0,9 \pm 0,3$, míg a kontroll növényeken $1,3 \pm 0,7$ gumó volt. A mutánsok gumószáma nem tért el szignifikánsan a kontrollétól. Szignifikánsan kevesebb gumót csak a gCDF1/1-hez viszonyítva a gCDF1/2 növényeken találtunk (12A ábra).

A növényeket a számolást követően visszaültettük és tovább neveltük üvegházi körülmények között, majd a vegetációs időszak végén ismét megszámloltuk a gumókat. Ekkor a gCDF1/1 növényeken átlagosan $1,9 \pm 0,7$, a gCDF1/2 növényeken $2,3 \pm 1,0$, a gCDF1/3 növényeken $1,2 \pm 0,4$ gumó volt. A kontroll növényeken átlagosan $1,6 \pm 0,7$ gumó volt. A gCDF1/2 növényeken szignifikánsan több gumó volt, mint a kontrollon és a gCDF1/3 növényeken, bár ezek kicsi gumók voltak (12B ábra).

A gumóhozam megállapítására a mutáns növényeken és a kontroll növényeken fejlődött gumók tömegét lemértük. A gumóhozam a következő képpen alakult: a gCDF1/1 növényeken átlagosan $29,7 \pm 3,2$, a gCDF1/2 növényeken $18,7 \pm 5,5$, a gCDF1/3 növényeken $26,6 \pm 4,05$ g gumó/növény volt. A kontroll növényeken átlagosan $24,4 \pm 5,1$ g gumó/növény volt. A gCDF1/1 gumóhozama szignifikánsan magasabb, míg a gCDF1/2 gumóhozama szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a gCDF1/3 és a kontroll növényeké (12C ábra).

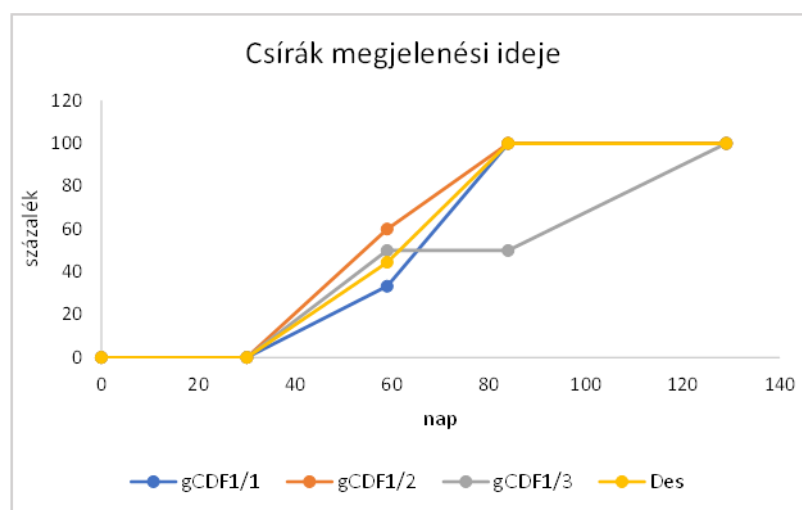


12. ábra: A gCDF1 mutánsok gumószáma a gumófejlődés kezdeti stádiumában (A) a vegetációs időszak végén (B) és gumóhozama a vegetációs időszak végén (C) a 'Désirée'-hez viszonyítva

A 'Désirée' egy piros héjú burgonyafaja. A gCDF1/1 és a gCDF1/3 gumói, bár eltérő mértékben, de világosabbak voltak, mint a kontroll 'Désirée' gumói (13A ábra). A gCDF1/2 gumói nem tértek el a kontrollétól. Mivel az antociánok határozzák meg a gumók színét, megmértük a gumóhéjak antocián tartalmát. A mérés megerősítette, hogy a gCDF1/1 és gCDF1/3 vonaloknak valóban világosabb a héjszíne, mint a kontrollé, bár ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (13B ábra).



13. ábra: A gCDF1 mutáns vonalak gumóhéjának színe (A) és gumóhéjának antocián tartalma (B) a 'Désirée'-hez viszonyítva



14. ábra: A gCDF1 mutáns vonalak csíráinak megjelenési időpontjai a 'Désirée'-hez viszonyítva

A megmért gumókat szobahőmérsékleten, sötétben tároltuk. A betakarítást követően az 59. napon jelentek meg először a csírák. A gCDF1/1 gumóinak 33%-án, a gCDF1/2 gumóinak 60%-án, a gCDF1/3 gumóinak 50%-án, míg a kontroll 'Désirée' gumóinak 44%-án volt csíra. A felszedést követő 84. napon a gCDF1/1, a gCDF1/2 és a 'Désirée' összes gumóján találtunk csírákat, míg a gCDF1/3 gumóinak csírázása elmaradt a többi vonalétól, itt csak a gumók 50%-án volt csíra. A felszedést követő 129. napon azonban már a gCDF1/3-nak is minden gumója csírázott (14. ábra).

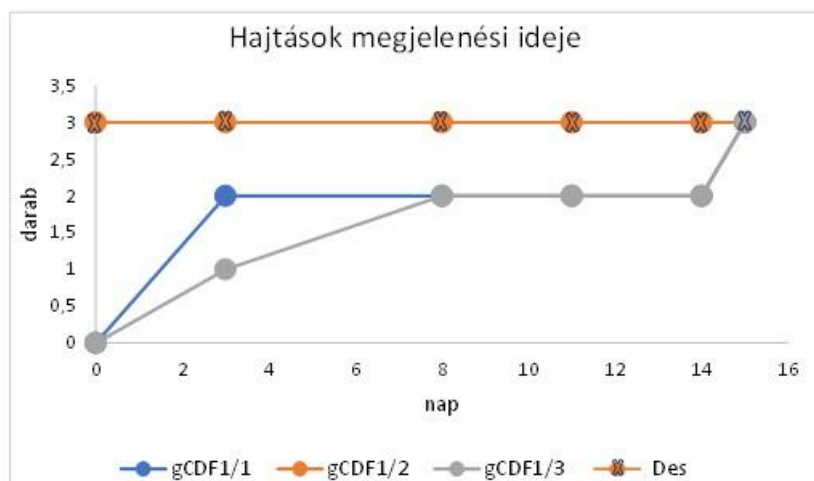
6.1.2.2. Gumóról szaporított növények jellemzése

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a gCDF1 mutáns vonalokból felszedett és kicsírázott gumókat (15. ábra) kiültetve üvegházi körülmények közé, milyen fenotípusú és gumójú növényeket kapunk. Mindegyik gCDF1 vonalból 3-3 gumót, míg a kontroll 'Désirée'-ből 6 gumót ültettünk el.



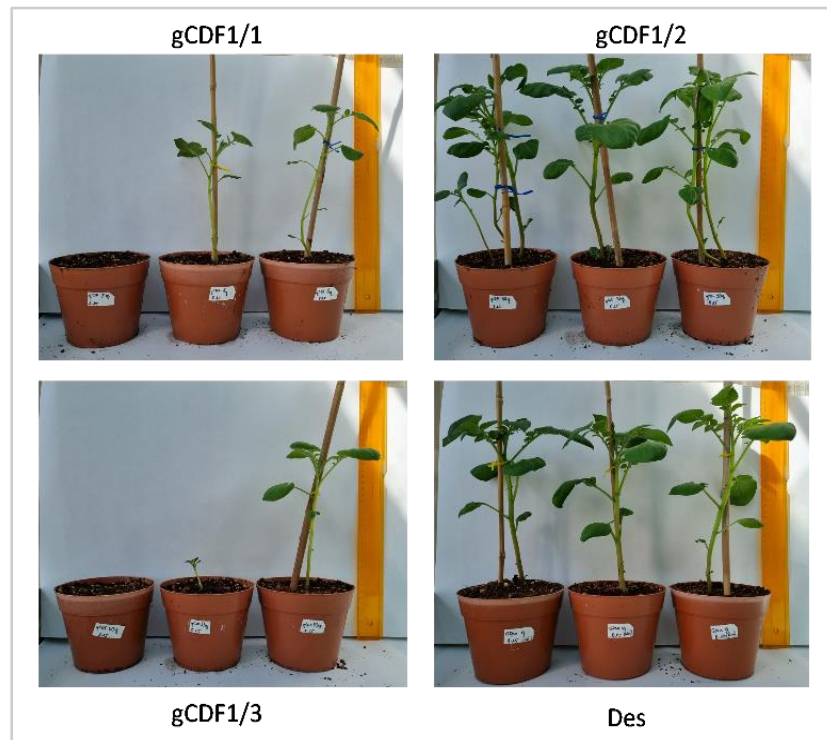
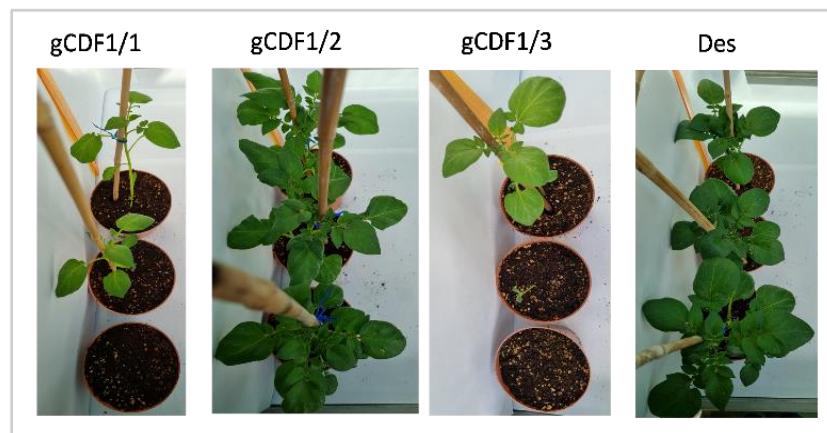
15. ábra: gCDF1 mutáns és 'Désirée' kontroll vonalak csírázott gumói kiültetés előtt

Megfigyeltük a kiültetett gumóról nőtt növények hajtásidejét (16. ábra). Egy hónappal az ültetés után mind a gCDF1/2, mind a kontroll 'Désirée' összes gumójából kihajtottak a növények. A gCDF1/1 esetében 3 nappal később 2 cserépben volt látható növény, majd 12 nappal később az összes cserépben kinőttek a növények. A gCDF1/3 gumókból jelentek meg legkésőbb a hajtások, csak 15 nappal az első 'Désirée' növények megjelenése után bújott ki a földből az összes növény.



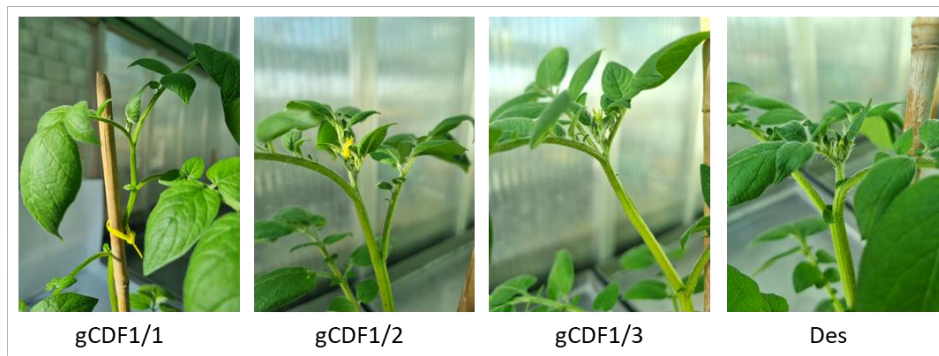
16. ábra: A gCDF1 mutáns vonalak gumóiból származó növények megjelenési ideje a 'Désirée'-hez viszonyítva

Hat héttel a gCDF1 gumók kiültetése után már látszódtak a mutánsok magasságbeli (17A ábra) és levélmorfológiai különbségei (17B ábra) a kontrollhoz képest. A gCDF1/1 és a gCDF1/3 növények alacsonyabbak voltak és fejlődésben is elmaradtak a gCDF1/2 és a kontroll növényektől. A vegetációs időszak elején a gCDF1/1 és a gCDF1/3 növények összetett leveleinek kialakulása (17B ábra), az *in vitro*-ból kiültetett növényekhez hasonlóan, késett. A gCDF1 mutánsok több csírából is hajtást növesztettek, ahogy az a gCDF1/2 esetében a 17A ábrán jól látható, míg a kontroll esetében a hajtásfejlődés egy rügyből történt.

A**B**

17. ábra: A gumóról kiültetett gCDF1 mutáns vonalak magassága (**A**) és levélmorfológiája (**B**) a 'Désirée'-hez viszonyítva a vegetációs időszak elején

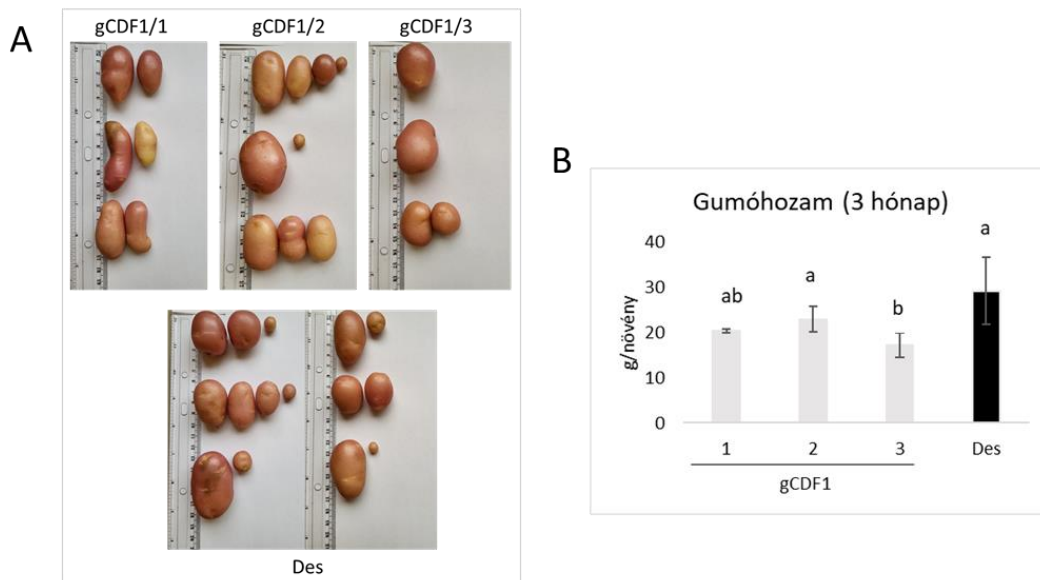
A gCDF1 gumóról ültetett növények esetében a vegetációs időszakban több növényen is megjelentek virágbimbók (18. ábra), bár ezek nem nyíltak ki (lehet, hogy egy fertőzés vagy rovarkár miatt). Kivételt képezett a gCDF1/1 mutáns vonal, melyen nem jelentek meg bimbók a vegetációs időszakban.



18. ábra: A gumóról ültetett gCDF1 mutáns vonalakon megjelent bimbók mérete és fejlettsége a 'Désirée'-hez viszonyítva

A vegetációs időszak végén a gumókat felszedtük (19A ábra), majd lemértük őket, hogy megállapítsuk van-e eltérés az *in vitro*-ból kiültetett növények és a gumóról kiültetett növények gumóhozama között. A gCDF1/1 növényeken átlagosan $20,4 \pm 0,4$, a gCDF1/2 növényeken $22,9 \pm 2,8$ a gCDF1/3 növényeken $17,1 \pm 2,7$ g/növény volt a gumóhozam. A kontroll növények átlagos gumóhozama $29,1 \pm 7,3$ g/növény volt. A gCDF1/1 és gCDF1/2 gumóhozama nem tért el szignifikánsan a kontroll növények átlagos gumóhozamától, míg a gCDF1/3 növényeké szignifikánsan alacsonyabb volt a 'Désirée' gumóhozamánál (19B ábra). A gCDF1/1 mutánsok esetében a gumók alakja hosszúkásabb, vékonyabb volt, mint a kontroll gumóké (19A ábra).

Az *in vitro*-ból kiültetett növényekhez képest a gCDF1/1 és gCDF1/3 gumóhozama alacsonyabb volt, míg a gCDF1/2 gumóhozama kis mértékben növekedett.



19. ábra: A gumóról ültetett gCDF1 mutáns vonalak gumói (A) és gumóhozama (B) a 'Désirée'-hez viszonyítva

6.1.3. A gCDF1 mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása

A CRISPR/Cas9 rendszer alkalmazása célzott mutagenézisre mára már széles körben elterjedté vált. Hofvander és munkatársai (2022), de a mi kutatócsoportunk is (Bánfalvi et al. 2020), sikerrel alkalmazta ezt a technikát a burgonyában. A *CDF1* mutánsok előállításakor is hatékonynak bizonyult a CRISPR/Cas9 rendszer, mivel 15%-os gyakorisággal kaptunk 49-117 bp hosszúságú deléciókat hordozó mutáns vonalakat. Három különböző méretű és elhelyezkedésű deléciós mutánst (gCDF1/1, gCDF1/2, gCDF1/3) választottunk ki a részletes vizsgálatokhoz, melyekben egy, illetve két nagy méretű deléciót találtunk, de nem kizárt, hogy további kisebb mutációk is jelen vannak ezekben a mutánsokban, melyeket még nem sikerült azonosítanunk.

Az *in vitro*-ból, de a gumókból fejlődött gCDF1/1 és gCDF1/3 mutánsokban is késett az összetett levelek kialakulása és az *in vitro*-ból kiültetett növények szára is vékonyabb, szártagjaik pedig megnyúltabbak voltak a kontroll 'Désirée' növényekénél. Ebből arra következtettünk, hogy a 'Désirée'-ben a *CDF1* szerepet játszik a hajtásfejlődésben. Eddigi publikációk alapján az volt ismert, hogy a *CDF1* a burgonyában részt vesz a gumófejlődés megindításában és gyengíti a szárazságtűrést (Kloosterman et al. 2013. Gonzales et al. 2021), míg más növényfajokban már számos más folyamattal is kapcsolatba hozták, mint pl. a fényre adott reakció vagy a virágzás ideje (Renau-Morata et al. 2020). Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a gumófejlődésen kívül a *CDF1*-nek más szerepe is lehet a burgonyában, mégpedig a hajtásfejlődés befolyásolása.

Mindhárom *CDF1* mutáns vonalban eltérő gumófejlődési és a gCDF1/1-ben eltérő gumómorfológiai jellemzőket kaptunk. Míg az *in vitro*-ból kiültetett növények esetében az egyik mutáns vonalnak kisebb, addig a másiknak nagyobb volt a gumóhozama, mint a kontrollé. A gumók csírázása is eltérően alakult a három mutánsban. Így nem lehetünk benne biztosak, hogy a *CDF1* szerepet játszik a gumófejlődésben a 'Désirée' burgonyafajtában. A három mutáns vonal eltérő gumófejlődését és csírázását magyarázhatjuk olyan *CDF1* mutációkkal, amiket még nem sikerült azonosítanunk, de nem zárhatjuk ki az ún. „off target” mutációkat sem. Emellett, mivel a három mutáns közül egyik sem null mutáns, bennük a Cas9 sejtszinten folyamatosan képes újabb mutációkat generálni, amiket bár PCR-rel nem tudunk azonosítani, de a gumófejlődésre és csírázásra hatással lehetnek.

A kimutatott deléciók egyike sem érte el a *CDF1* kódoló régióját, mégis fenotípusos változást okozott. Az mRNS-ek 3' nem-transzlálódó régióinak szerepe lehet az mRNS stabilitásában és transzportjában. Kötődhetnek hozzájuk mikroRNS-ek, fehérjék, amik befolyásolhatják a transzláció hatékonyságát (Nyitra és Pál 2013). A gCDF1 mutánsokban a deléciók kívül esnek a poliadenilációs jelen, de a mutációk, a számítógépes predikció szerint, jelentős változást okoztak a *CDF1* mRNS 3' végének szerkezetében. Elképzelhető, hogy ez a változás megakadályozza a szabályozó fehérjék kötődését és csökkenti a transzláció hatékonyságát. A FLORE szabályozó lncRNS-t is lerövidítették a deléciók, aminek szintén szerepe lehet a fenotípusos változásokban, viszont ennek a mechanizmusa jelenleg még nem ismert.

6.2. *GI* gének azonosítása burgonyában

A burgonyában a *GI* gének azonosításához az NCBI Blast segítségével az *Arabidopsis thaliana* *GI* (*AtGI*) NM_102124 homológját kerestük meg. Két olyan transzkriptum variánst találtunk, melyek 71,8-72,9%-ban azonosak voltak az *AtGI*-vel. Az egyik a 4. kromoszómán (XM_006358978.2), a másik a 12. kromoszómán helyezkedett el (XM_006361554.2), így a 4. kromoszómán lévő *GI.04*-nek, a 12. kromoszómán található *GI.12*-nek neveztük el. A két változat kódoló régiója 83,7%-os azonosságot mutatott (7. melléklet).

A *Solanum tuberosum* Phureja Spud DB-ben kikerestük a két *GI* variáns promóter szekvenciáját. A két promóter szekvenciát az NCBI BLAST alapértelmezett beállításával összehasonlítottuk egymással és az *AtGI* promóterével. Nem találtunk szignifikáns hasonlóságot sem a két burgonya *GI* promótere, sem az *AtGI* és a burgonya *GI* promóterek között.

adott válasz; CB, a másodlagos sejttal biogenezisének szabályozása; CC, a sejtciklus pozitív szabályozása; CD, sejt differenciálódás; Cd, kadmium-ionra adott válasz; CF, sejtorsos specifikáció; Ch, kitinre adott válasz; CR₁, cirkadián ritmus; CR₂, génexpresszió cirkadián szabályozása; CR₃, cirkadián ritmus pozitív szabályozása; CW, sejttal módosítása; DS, vízhiányra adott válasz; E, etilénre adott válasz; F, fagyra adott sejtválasz; FD₁, a virágfejlődés pozitív szabályozása; FD₂, fotoperiodikus virágzás; FD₃, pollenérés; FD₄, a virág merisztéma azonosságának fenntartása; FD₅, szírom morfogenezis; FR, vörös vagy távoli vörös fény jelátvivő útvonal; GA₁, gibberellinre adott válasz; GA₂, gibberellinsav által közvetített jelátviteli útvonal; Glu₁, glükóz által közvetített jelátviteli útvonal; Glu₂, sejtválasz glükózra; H, hőstresszre adott sejtválasz; HP, a hidrogén-peroxid anyagcsere folyamatának szabályozása; JA, jázminsavra adott válasz; LB, lignin bioszintézis; LD, levélfejlődés; OB, szervhatár meghatározása az oldalsó szervek és a merisztéma között; PM₁, fotomorfogenezis; PM₂, a fotomorfogenezis szabályozása; PO, pollenfejlődés; RD, gyökérfejlődés; SA, szalicilsavra adott válasz; SD, magfejlődés; SG₁, magok csírázása; SG₂, a mag csírázásának negatív szabályozása; SS, sóstresszre adott válasz; Suc, szacharóz indukálta transzlációs represszió; UV, UV-B-re adott válasz; XD₁, xilém és floém mintázat kialakulása, xilém kialakulása; XD₂, floém vagy xilém hisztogenezis. Az üres körök ismeretlen funkciójú TF-okat jelölnék.

Annak megállapítására, hogy a burgonya *GI.04* génjének szabályozása mennyire hasonló az *Arabidopsis GI* génjéhez, az *Arabidopsis GI* génjének -3,0 kb-os szekvenciájában is azonosítottuk a PlantRegMap segítségével a TF kötőhelyeket és összehasonlítottuk a 'Désirée' *GI.04* promóterben talált kötőhelyekkel. A program 160 kötőhelyet jósolt 106 TF számára az *AtGI* promóter régiójában, de számos TF ugyanahhoz a családhoz tartozott és átfedő kötőhelyeket is felismert. Az *AtGI* és a *GI.04* promóterekhez kapcsolódó összes TF család azonos volt (21. ábra). Bár az NCBI BLAST összehasonlítása alapján az *AtGI* és a *GI.04* promóter szekvenciák összességében nem mutattak szignifikáns homológiát, de hasonló biológiai folyamatokat szabályozó TF kötőhelyeket tartalmaztak.

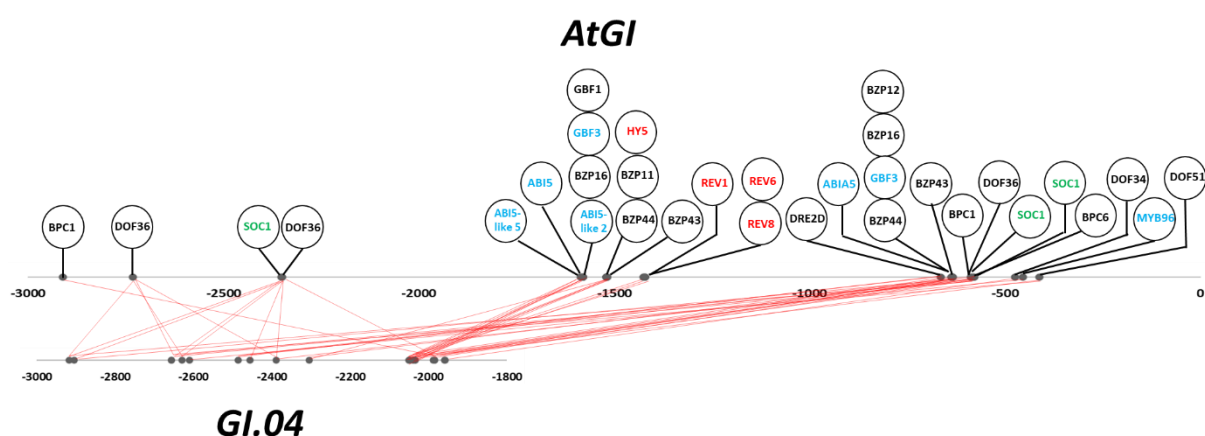
Az *AtGI* promóterben három különböző, olyan TF család (MYB-related, GATA és bZIP) tagjai által felismerhető kötőhelyet találtunk, amelyek részt vesznek a cirkadián ritmus szabályozásában. A MYB-hez tartozó TF-ok a LHY1, a REV1 és/vagy a REV8 voltak. Az LHY1-nek két kötőhelye is volt, amelyek körülbelül -1,2 és -1,4 kb-ra helyezkedtek el a startkodontól. A GATA TF-t GATA25-ként, a bZIP TF-t HY5-ként azonosítottuk. Az *AtGI* promóterben cirkadián ritmushoz kapcsolódó TF kötőhelyeket a *GI.04* promóterben is megtaláltuk, viszont a *GI.04*-ben ez -0,5 kb-sal távolabb helyezkedett el a transzkripció kezdőhelyétől, mint az *AtGI*-ben, és minden TF-nak csak egyetlen kötőhelye volt (21. ábra).

Az *AtGI* részt vesz a virágzási idő szabályozásában (Rédei 1962). Virágfejlődést befolyásoló TF kötőhelyeket találtunk az *AtGI* promóterben. Ezek a CDF5, TSO1, SOC1-like (AGL20-like) és a LHY1 kötőhelyei voltak. A burgonya *GI.04* promóterben a virágzáshoz

kapcsolódóan a SOC1-like (Lee et al. 2000), MYB17, REV8 (Singh és Mas 2018) és a CMB1-like kötőhelyeit találtuk meg.

A rövid nappalos gumózású burgonyában a *GI* nemcsak a virágzási időt, hanem a gumók kezdeti fejlődését is közvetetten szabályozza (Kloosterman et al. 2013). A gumózással kapcsolatba hozható POTH20 (KNOX1) kötőhelyet a *GI.04*-ben -2,0 és -2,5 kb-nál találtuk meg, míg az *AtGI* promóterében ilyen kötőhely nem volt.

Az *AtGI* promóter -1,8 kb szakaszától 5' irányban már alig találtunk hasonló motívumokat az *Arabidopsis* és burgonya között.



21. ábra: Az *Arabidopsis* és a 'Désirée' *GI.04* promóteréhez egyaránt kötődő transzkripciós faktorok elhelyezkedésének sematikus rajza. A cirkadián ritmushoz, a virágfejlődéshez és az ABA-ra adott válaszhoz kapcsolódó TF-ok neve piros, zöld és kék színnel van kiemelve. BPC1, BASIC PENTACYSTEINE 1; DOF36, DNA BINDING WITH ONE FINGER 36; SOC1, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1; ABI5-like5, ABA-INSENSITIVE 5-LIKE 5; ABI5, ABA-INSENSITIVE 5; GBF1, G-BOX BINDING FACTOR 1; GBF3, G-BOX BINDING FACTOR 3; BZP16, BASIC LEUCINE-ZIPPER 16; ABI5-like2, ABA-INSENSITIVE 5-LIKE2; HY5, LONG HYPOCOTYL 5; BZP11, BASIC LEUCINE-ZIPPER 11; BZP44, BASIC LEUCINE-ZIPPER 44; BZP43, BASIC LEUCINE-ZIPPER 43; REV1, REVERSIONLESS 1; REV6, REVERSIONLESS 6; REV8, REVERSIONLESS 8; DRE2D, DROUGHT-RESPONSIVE ELEMENT 2D; BZP12, BASIC LEUCINE-ZIPPER 12; BPC6, BASIC PENTACYSTEINE 6; DOF34, DNA BINDING WITH ONE FINGER 34; MYB96, MYELOBLASTOSIS 96; DOF51, DNA BINDING WITH ONE FINGER 51

6.2.2. Cisz szabályzó elemek a *GI.04* promóterben

A PlantRegMap által a burgonya *GI.04* gén promóterében azonosított *cisz* szabályzó elemeket (*cis*-acting regulatory elements, CAREs; 22. ábra) öt fő kategóriába soroltuk be: cirkadián ritmus szabályozás, növényfejlődés, virágfejlődés, stressz- és hormonválaszok és ismeretlen biológiai folyamatokban résztvevő TF-ok kötőhelyei. A *GI.04* promóterében azonosítottunk egy

EVENING ELEMENT (EE) motívumot, aminek konszenzus szekvenciája az AAAATATCT (Harmer et al. 2000) -2051 bp-nál kezdődik, és amihez a cirkadián szabályozással kapcsolatos REV1 és/vagy a REV8 kötődni tud. A REV8 részt vesz még a virágfejlődés szabályozásában (Gray et al. 2017) és az ABA-ra adott válasz szabályozásában is (Tian et al. 2019, PlantRegMap). A *GI.04* promóter negatív szálán GATATTT (GATA-box; Zhou et al. 2008) konszenzus szekvenciával rendelkező CARE-t is találtunk. De a *GI.04* promóterben megjelent az M-type MADS-box TF, a SOC1-like, jellegzetes TTTTTTTTTTTTTTTTTT motívuma (Tian et al. 2019; PlantRepMap), valamint az ABA-responsive ABI TF kötőhelye, az ACGTG (Choi et al. 2000) is. A POTH20 CARE-je megtalálható volt -1988 bp-nál és -2478 bp-nál kezdődően. A PlantRegMap alapján a *GI.04* promóterben megtalálható a Berns és munkatársai (2014) által ABA RESPONSE ELEMENT-ként (ABREL-ként) definiált CACGT motívum -1425 bp-nál, -2034 bp-nál és -2303 bp-nál, ami azért fontos, mert az EE elemekkel együtt erős diurnális szabályozást biztosíthat a *GI.04* átírásának.



22. ábra: A *GI.04* promóterében található CARE-ek. REV1, REVERSIONLESS 1; REV8, REVERSIONLESS 8; HY5, LONG HYPOCOTYL 5; GATA1-like, GATATTT motívumot felismerő TF; SOC1-like, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1-like; MYB17, MYB domén ismétlődést hordozó TF 17; CMB1-like, CYTOSINE MISMATCH BINDING-like 1; GBF3, G-BOX BINDING FACTOR 3; ABI5, ABA-INSENSITIVE 5; ABI5-like2, ABA-INSENSITIVE 5-like 2, ABI5-like5, ABA-INSENSITIVE 5-like 5; CPRF2, COMMON PLANT REGULATORY FACTOR 2; MYB96, MYB domén ismétlődést hordozó TF 96; REV6, REVERSIONLESS 6; POTH20, POTATO HOMEODOMAIN 20

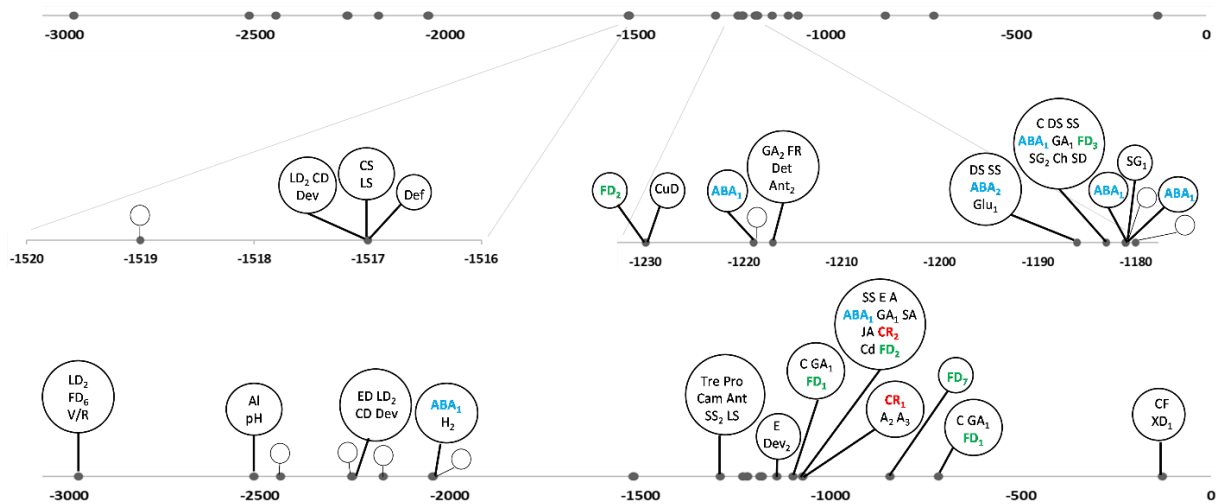
6.2.3. A *GI.12* promóter elemzése

A *GI.12* feltételezett promóter régiójának megismeréséhez primereket terveztünk a *S. tuberosum* Phureja 12. kromoszómáján lévő *GI* gén promóter szekvenciájára és PCR-rel felszaporítottuk az ennek megfelelő fragmentumot a 'Désirée' genomi DNS-éből. Két primerpárt terveztünk, amelyek a StGI.12 -2837 FW és StGI.12 -1586 R, StGI.12 -1586 Fw és StGI.12 +59 R voltak. Szekvenciájuk az 5. melléklet G részében található.

A 'Désirée' *GI.12* promóter régióját lefedő két fragmentumot klónoztuk és szekvenáltattuk. A 'Désirée' *GI.12* promótere, akárcsak a *GI.04* promótere, nagymértékben hasonlított a Phureja-éhoz (9. melléklet), azonban a Phureja-hoz képest 3 klónban volt egy 14 bázispáros inszerció hozzávetőlegesen -1,7 kb-nál és négy klónban pedig egy 8-9 bázispáros inszerció -0,3 kb körül. Mivel nem mind a négy klónban volt -1,7 kb-nál inszerció, arra a következtetésre jutottunk, hogy a 'Désirée'-nek legalább két *GI.12* allélja van.

A PlantRegMap segítségével elemeztük a burgonya *GI.12* promóterének szekvenciáját, hogy abban is megtaláljuk a TF-ok kötőhelyeit. A PlantRegMap 32 kötőhelyet prediktált a *GI.12* promóterben. A kötőhelyekhez 13 családba tartozó, 27 különböző TF tud csatlakozni. A családok a következők: BBR-BPC, bHLH, bZIP, C2H2, Dof, ERF, HB-other, HD-ZIP, M-type_MADS, MIKC_MADS, MYB_related, NAC és TCP.

A *GI.12* -3,0-kb-os promóter régiójában a TF kötőhelyek elhelyezkedése és azok a biológiai folyamatok, amikben résztvesznek a hozzájuk kötődő TF-ok, a 23. ábrán látható. A *GI.12* promóterben, a *GI.04* promóteréhez hasonlóan, ABA jelátvitelhez, cirkadián órához és virágfejlődéshez kapcsolódó TF kötőhelyeket azonosítottunk, de míg ezek a helyek a *GI.04* promóterében -2.0 kb körül csoportosultak, addig a *GI.12* promóterében főleg -1.1 és -1.2 kb között voltak. De mindemellett találtunk még pl. kadmium ionra és savas pH-ra reagáló TF kötőhelyeket is.

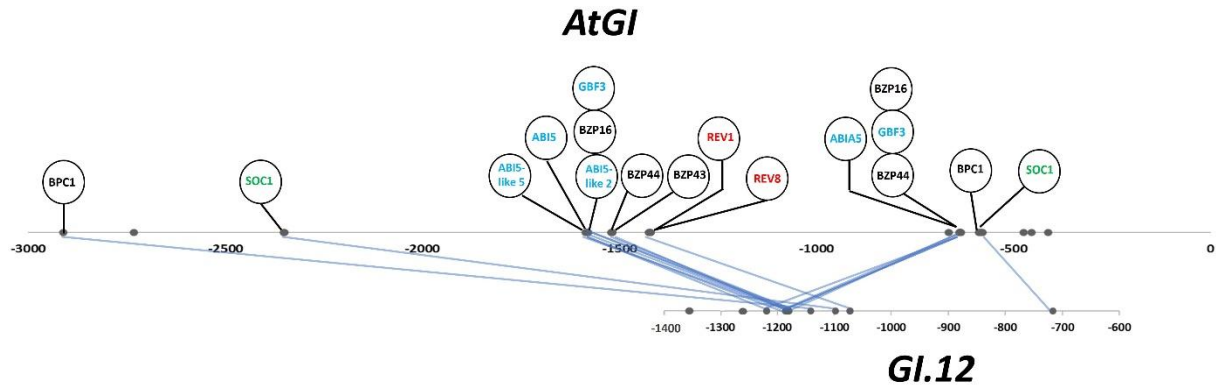


23. ábra: A *GI.12* gén -3 kb-os promóter régiójának sematikus rajza. Kékkel az ABA, pirossal a cirkadián óra és zölddel a virágfejlődéshez kapcsolódó TF-ok vannak kiemelve. A, auxinra adott válasz; A₂, auxin által aktivált jelátviteli útvonál; A₃, az auxin bioszintetikus folyamatának szabályozása; ABA₁, abszcizinsavra adott válasz; ABA₂, abszcizinsav által aktivált jelátviteli útvonál; Al, alumínium ionra adott válasz; Ant, antocianin tartalmú vegyület bioszintetikus folyamata; Ant₂, az antocianin metabolikus folyamatának pozitív szabályozása; C, hideg stresszre adott válasz; Cam, kamalexin bioszintézis; CD, sejtdifferenciálódás; Cd, kadmium ionra adott válasz; CF, sejtsors specifikáció; Ch, kitinre adott válasz; CR₁, cirkadián ritmus; CR₂, a génexpresszió cirkadián szabályozása; CuD, kutikula fejlődése; CS, sejt méret szabályozása; Def, védekezés szabályozása; Det, de-etioláció; Dev, a fejlődés pozitív szabályozása; Dev₂, a fejlődési folyamat szabályozása; DS, vízhiányra adott válasz; E, etilénre adott válasz; ED, magnyugalomhoz vezető embriófejlődés; FD₁, a virágfejlődés pozitív szabályozása; FD₂, fotoperiodizmus és virágzás; FD₃, pollenérés; FD₆, virágmerisztéma meghatározása; FD₇, virágszervek meghatározása; FR, vörös és távoli vörös fény érzékelése; GA₁, gibberellinre adott válasz; GA₂, gibberellinsav által közvetített jelátviteli útvonál; Glu₁, glükóz által közvetített jelátviteli útvonál; H₂, hő akklimatizáció; JA, jázminsavra adott válasz; LD₂, levélmorfogenezis; LS, a levelek öregedésének negatív szabályozása; pH, savas pH-ra adott válasz; Pro, prolin bioszintézis; SA, szalicilsavra adott válasz; SD, magfejlődés; SG₁, magcsírázás; SG₂, magcsírázásának negatív szabályozása; SS, sóstresszre adott válasz; SS₂, hiperozmotikus sóstresszre adott válasz; Tre, trehalóz bioszintézis; XD₁, xilém és floém mintázat kialakulása; V/R, a vegetatív fázisból a szaporodási fázisba való átmenet időzítésének szabályozása. Az üres körök ismeretlen funkciójú TF-okat jelölnék.

Az *AtGI* promóterben cirkadián ritmushoz kapcsolódó TF-ok kötőhelyeit a *GI.12* promóterében is megtaláltuk, viszont a *GI.12*-ben csak a REV1 és/vagy a REV8 kötőhelyek voltak jelen a transzlációs starthelytől -1,1 kb-ra. A *GI.12* promóterben a virágzáshoz kapcsolódóan a bHLH30, ATHB51, SOC1, FBP1 és a REV8 kötőhelyeket találtuk.

Mint ahogy már a *GI.04*-nél is említettük, a rövid nappalos gumózású burgonyában a *GI* a gumófejlődés megindulását is befolyásolja. A *GI.12* promóterben -0,1 kb-nál, a *GI.04*-hez hasonlóan, megtaláltuk a POTH20 (KNOX1) kötőhelyet.

Az *AtGI* és a *GI.12* között a legnagyobb hasonlóság az *AtGI* promóter két helyére koncentrálódott (-0,6 kb és -1,6 kb), amelyek homológok voltak a *GI.12* promóter -1,2 kb körüli régiójával. A *GI.12* esetében nem volt kimutatható homológia az *AtGI* promóterrel -1,3 kb-tól 5' irányban (24. ábra).



24. ábra: Az *Arabidopsis* és a 'Désirée' *GI.12* promóteréhez egyaránt kötődő TF-ok elhelyezkedésének sematikus rajza. A cirkadián ritmushoz, a virágfejlődéshez és az ABA-ra adott válaszhoz kapcsolódó TF-ok neve piros, zöld és kék színnel van kiemelve. BPC1, BASIC PENTACYSTEINE 1; SOC1, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1; ABI5-like5, ABA-INSENSITIVE 5-like 5; ABI5, ABA-INSENSITIVE 5; GBF3, G-BOX BINDING FACTOR 3; BZP16, BASIC LEUCINE-ZIPPER 16; ABI5-like 2, ABA-INSENSITIVE 5-like 2; BZP44, BASIC LEUCINE-ZIPPER 44; BZP43, BASIC LEUCINE-ZIPPER 43; REV1, REVERSIONLESS 1; REV8, REVERSIONLESS 8

6.2.4. Cisz szabályzó elemek a *GI.12* promóterben

A *GI.12* promóterében is azonosítottunk egy EVENING ELEMENT (EE) motívumot, amelynek konszenzus szekvenciája az AAAATATCT (Harmer et al. 2000) -1072 bp-nál kezdődik (25. ábra). A *GI.12* promóterben is megjelent a GATATTT (GATA-box) motívum, a TTTTTTTTTTTTTTTTTT MADS-box SOC1-like motívum, valamint az ACGTG (ABA-responsive ABI) motívum is. A POTH20 CARE-je -127 bázispárnál található. A Berns és munkatársai (2014) által meghatározott ABREL-hez tartozó CACGT motívum -1179 bázispárnál kezdődik.

TTTACAATATTTAATGTTCTCATTGAAATTATTGGCGCATACTGTATTTAATT...-2070
 TCACATTTTCGCATACCATCATATTCACCTCACACCTCCTCACTAGGCATC...-1264
 AAAGTAGGTATGTATGTGATGATGAAGCAATTAGTCCACTTGCTTGCCACATGGCCCTCTTA
 AGATCTGAGGAAAATATCATCGCCACGTATGCATTGAGAAAACACAGCTAAAGATCTTCTTT
 CTGCTCCATATCTTTTTCTCTTTTAAACTCTTCTTCTCCCTCCTTGATTTTTTTTCTCTCC
 AAATCCC AAAATATCTCCCTAAAATCCTTCTTTTTTTTTTCCAGATTTACCCTC...-1016
 GGTTTTTTAAAAAAGTTGTGCAACAGTTTTATTGTACTATTTTCGATTTTCTTTTTTTTAGG
 AATAAGAATTGAGAAACAGTATATAATTGGAGAATTGATTATACTTCTAATTTATTTGAAAA
 TATTTTTTTTTTTTTTTGACAATTTGTGCAAGTGATAATTTTCTGTTAATGGGAAAATGAAAA
 AAAAGAA GAAGTTTTTTGTTCGGTTTATTTTCAGATCATTTTGATGAATTAATAC...-148
 TAATTATGAACCCCATTAACCTTACTAGTTCGCCCCCTGCTGGACCATCCTTGGA...-86

 REV1, REV8 bHLH130 ATHB51 SOC1 FBP1 GBF3
 POTH20 ABI5, ABI5-like2, ABI5-like5, CPRF2, HY5
 DREB2A-like REV8

25. ábra: A *Gl.12* promóterében található CARE-ek. REV1, REVERSIONLESS 1; REV8, REVERSIONLESS 8; bHLH130, basic HELIX-LOOP-HELIX 130; ATHB51, *A. thaliana* HOMEBOX 51; SOC1, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1; FBP1, F-BOX PROTEIN 1; GBF3, G-BOX BINDING FACTOR 3; POTH20, POTATO HOMEBOX 20; ABI5, ABA-INSENSITIVE 5; ABI5-like2, ABA-INSENSITIVE 5-LIKE 2, ABI5-like5, ABA-INSENSITIVE 5-LIKE 5; CPRF2, COMMON PLANT REGULATORY FACTOR 2; HY5, LONG HYPOCOTYL 5; DREB2A-like, DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2A-like

Mint azt már fentebb írtuk, a Phureja-val összehasonlítva két inszerciót detektáltunk a 'Désirée' *Gl.12* promóter régiójában. Az egyik az etilénre és a fejlődésben résztvevő szabályozó génekre reagáló BASIC PENTACYSSTEINE-LIKE BBR-BPC család tagjainak feltételezett kötőhelye, a másik a stresszfaktorok és az etilén által közvetített stressz jelátviteli útvonalában szerepet játszó ERF-típusú TF-ok által felismerhető motívum volt.

6.2.5. A *GI* gének promóter elemzéséből kapott eredmények megvitatása

A *GI* növény-specifikus gén, ami többféle biológiai funkcióban is részt vesz. Megállapítottuk, hogy a *GI* gént tekintve a 'Désirée' burgonya fajtában duplikáció történt, mivel abban két *GI* gén található, melyek szekvenciájukban számos helyen azonosak, de eltérést is mutatnak mind a promóter-, mind pedig a kódoló régióban.

A különböző növényfajok *GI* génjeinek expressziója napi szabályozási ciklust mutat, ami így van a *S. tuberosum* ssp. Andigena-ban és a Neo-Tuberosum burgonyában is (Morris et al. 2014). A 'Désirée' mindkét *GI* génjének promóterében megtaláltuk az EE motívumot, ami a REV1/8 kötőhelye, aminek működése a cirkadián szabályozással kapcsolatos. Emellett megállapítottuk azt is, hogy az ABREL elemek, amelyek az EE-ekkel kombinálva nélkülözhetetlenek ahhoz, hogy a *GI* expressziójának nagy amplitúdójú mintázatot biztosítsanak az *Arabidopsis*-ban (Berns et al. 2014), szintén jelen vannak mindkét burgonya *GI* promóterben az EE motívum közelében. Feltételezzük tehát, hogy a *GI.04* és a *GI.12* expressziójának szabályozása is a napi ciklushoz köthető.

A *GI* gének kulcsszerepet játszanak a virágzási jelátviteli útvonal szabályozásában (Brandoli et al. 2020a,b). A PlantRegMap mindkét burgonya *GI* promóter esetében talált virágfejlődésben résztvevő TF-ok (pl. a SOC1 vagy az ABI5) számára kötőhelyeket, pedig korábban Odgerel (2022) azt találta, hogy a *GI.04* minden virágszervben expresszálódik, míg a *GI.12* egyik virágszervben sem. A *GI.12* valószínűleg a virágfejlődés korai szakaszában aktív, míg a kifejlett virágban már nincs szükség a működésére.

A *GI* gén a *S. tuberosum* ssp. Andigena-ban kulcsszerepet játszik a gumófejlődésben (Kloosterman et al. 2013). A 'Désirée' mindkét *GI* génjének promóterében megtaláltuk a POTH20 kötőhelyét. Rosin és munkatársai (2003) kimutatták, hogy a POTH1, a POTH20-szal 73%-ban azonos. A POTH1 túltermeltetése fokozza az *in vitro* gumósodást mind rövid nappalos, mind hosszú nappalos körülmények között a *S. tuberosum* ssp. Andigena-ban. Ha a POTH20 helyettesíteni tudja a POTH1-et 'Désirée'-ben, akkor a *GI* expressziójának, és ezáltal a gumófejlődésnek is, alternatív, pozitív szabályozója lehet.

A *GI* részt vesz az abiotikus stresszre adott válaszok szabályozásában és néhány növényfajnál kimutatták, hogy a *GI* levelekben történő expresszióját a stressz befolyásolja (Jose és Bánfalvi 2019). A *GI.04* expresszióját a hideg, a hő és az ozmotikus stressz indukálja, míg a *GI.12*-t az ABA felfelé, a só, a hideg, a meleg és az ozmotikus stressz lefelé szabályozza, azaz a két *GI* gén eltérő módon reagál a stresszre (Odgerel 2022). A különbségek egyik oka az lehet, hogy a *GI.04*-ben vannak MYB TF kötőhelyek, míg a *GI.12*-ben nincsenek. Megjegyezzük

azonban, hogy az ABA-ra reagáló TF-ok kötőhelye, az ACGTG motívum, mindkét *GI* promóterben jelen van.

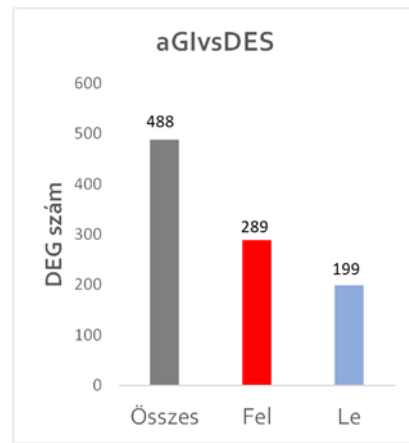
Az *Arabidopsis GI* és a két 'Désirée' *GI cisz* szabályzó elemeinek összehasonlítása több közös elemet is kimutatott. Érdekes módon azonban az *AtGI* promóterben ezek a *cisz* szabályzó elemek körülbelül -1,5 kb és -0,6 kb-ra voltak a transzlációs starthelytől, addig a *GI.04* promóterben ezek -2.0 kb-nál, a *GI.12*-ben pedig -1.2-kb-nál helyezkedtek el, ami arra utal, hogy a *GI* gének evolúciója során nemcsak génduplikáció ment végbe, hanem a promóter régió is változott, amit talán inszerciók okoztak.

A *GI.12* expressziós szintje a gyökér- és a hajtásszervekben kb. ötszöröse, a gumókban pedig harmincszorosa volt a *GI.04* expressziós szintjének (Odgerel 2022). A transzkripció szabályozása összetett folyamat, ami a TF-ok elérhetőségétől, aktivitásától, valamint a promóterben és környékén jelenlévő szabályzóelemek típusától, számától, helyzetétől és kombinációjától függ (Hernandez-Garcia és Finer 2014). Így feltételezzük, hogy a *GI.12* magasabb aktivitása azzal magyarázható, hogy a *cisz* szabályzó elemek nagyobb közelségben vannak a transzlációs starthelyhez a *GI.12* promóter régióban, mint a *GI.04* promóterben.

6.3. Az aGI52 levelek transzkriptom elemzése

A *GI.04* gén szerepének vizsgálatára Jose (2019) antiszensz gátolt *GI.04* mutánsokat hozott létre levéltranszformációval a 'Désirée' burgonyafajtában. Odgerel (2022) RT-qPCR-rel tesztelte az antiszensz gátolt vonalakban a *GI.04* expresszióját és öt vonalat választott ki a további vizsgálatokra. A legnagyobb gátlás a 'Désirée' kontrollhoz képest az aGI52 növényekben volt, ahol 49%-os, viszonylag stabil csökkenés volt a *GI.04* expressziójában. Ezért ezt a vonalat választottuk ki a transzkriptom vizsgálatához.

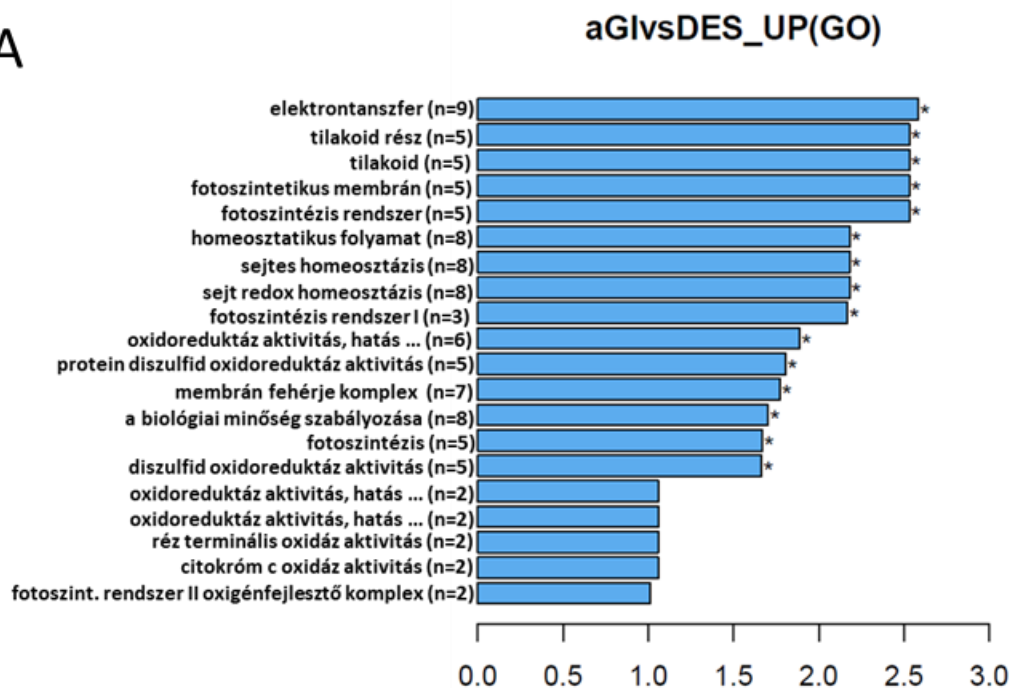
A *GI.04* gátlás transzkriptom szintű hatásának vizsgálatára RNS szekvencia analízist végeztünk a Novogene céggel üvegházban nevelt aGI52 levelekből izolált RNS-ekből három biológiai ismétlésben. 454 olyan gént találtunk, ami csak a 'Désirée'-ben és 247 olyat, ami csak az aGI52-ben fejeződött ki ($\log_2(\text{Fold Change}) > 1$ és $\text{padj} < 0,05$; 26A ábra). 488 differenciálisan expresszáldó gént (DEG-et) kaptunk (26B ábra), melyből 289 felfelé és 199 lefelé szabályozódott az aGI52-ben.

A**B**

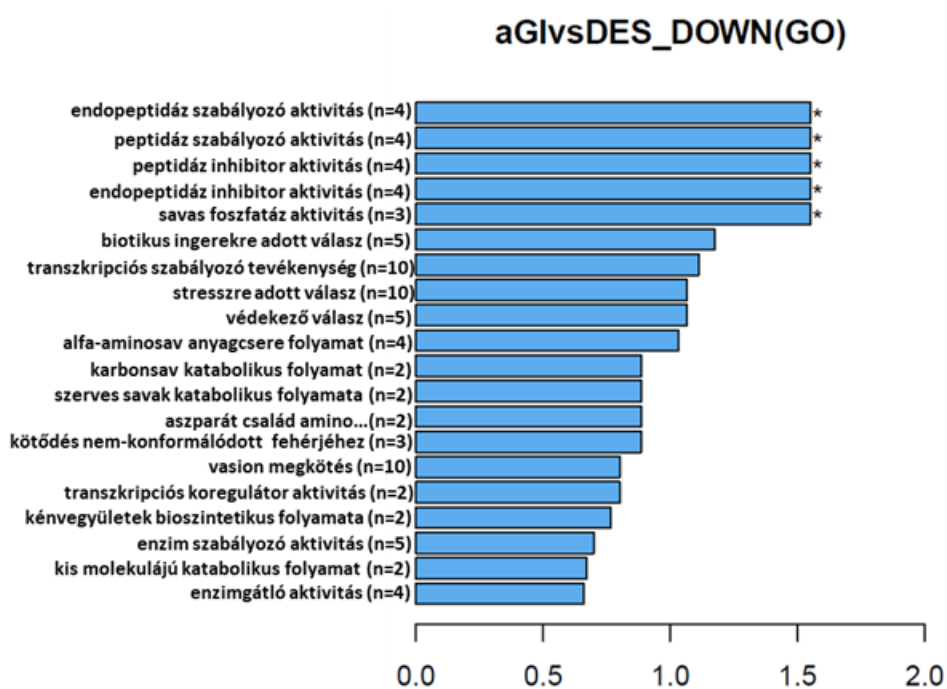
26. ábra: Az unikálisan és differenciálisan expresszálódó gének száma az aGI52 levelekben a 'Désirée' levelkhez viszonyítva. **(A)** Az aGI52-ben és a 'Désirée'-ben eltérően és azonosan expresszálódó gének száma Venn diagrammal ábrázolva. **(B)** az aGI52-ben a 'Désirée'-hez viszonyítva felfelé és lefelé szabályozott gének száma

A génontológiai (GO) elemzés kimutatta, hogy főként azok a gének megnyilvánulása volt magasabb (27A ábra), amelyek a fotoszintézishez kapcsolódnak, míg a peptidázok és a peptidáz inhibitorok expressziója gátolt volt az aGI52-ben (27B ábra).

A



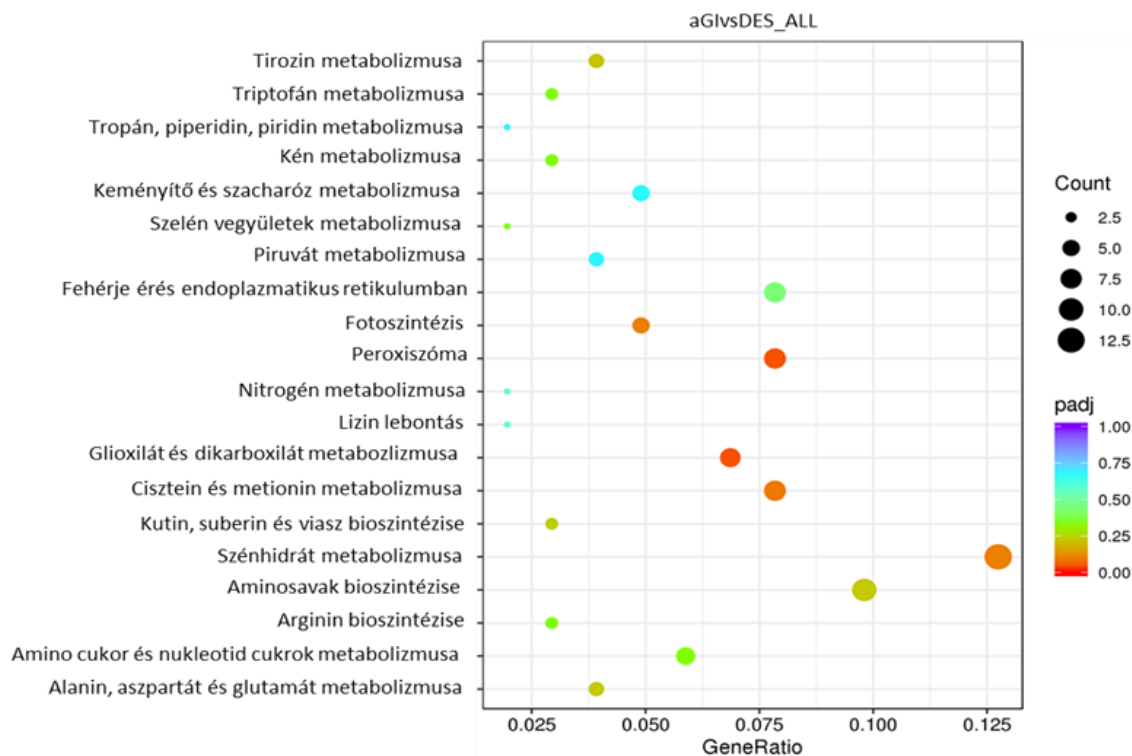
B



27. ábra: A felfelé (A) és lefelé (B) szabályozott GO-kat ábrázoló oszlopdiagram. A zárójelben a DEG-ek száma látható. A szignifikánsan változott GO-kat a csillagok jelölik.

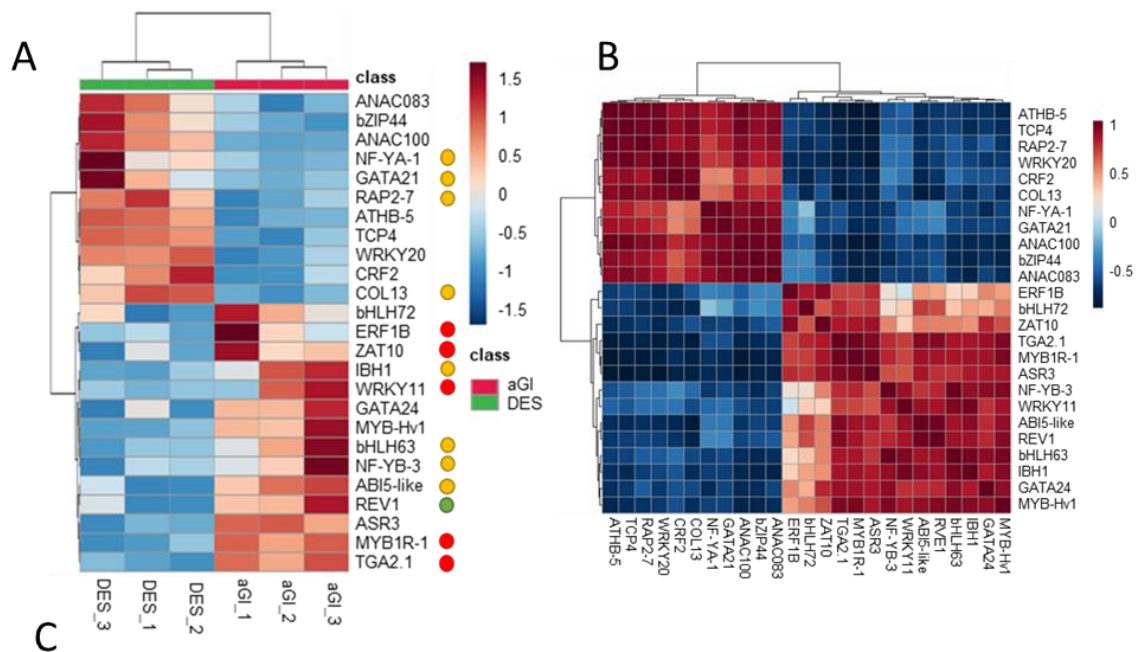
A KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) elemzés kimutatta (28. ábra), hogy egyes útvonalak, mint pl. a glioxalát- és dikarboxilát metabolizmus, a szénhidrát metabolizmus és a peroxisómális útvonalak aktiválódtak, míg egyes aminosavak metabolizmusa, mint pl. a nitrogén metabolizmus, a lizin lebontás, a szelén vegyületek

metabolizmusa gátlódott. Bár megjegyezzük, hogy egyik útvonal sem változott meg szignifikánsan (korrigált $p > 0,05$).



28. ábra: A KEGG elemzés eredménye az aGI52-es levelek RNS szekvencia adatait a 'Désirée'-hez viszonyítva

A TF-ok a növények fejlődésének és stresszválaszainak kulcsfontosságú szabályozói. Ezért további elemzésünket a TF DEG-ekre összpontosítottuk. Az aGI52-ben 14 felfelé és 11 lefelé szabályozott TF-t találtunk (29A ábra).

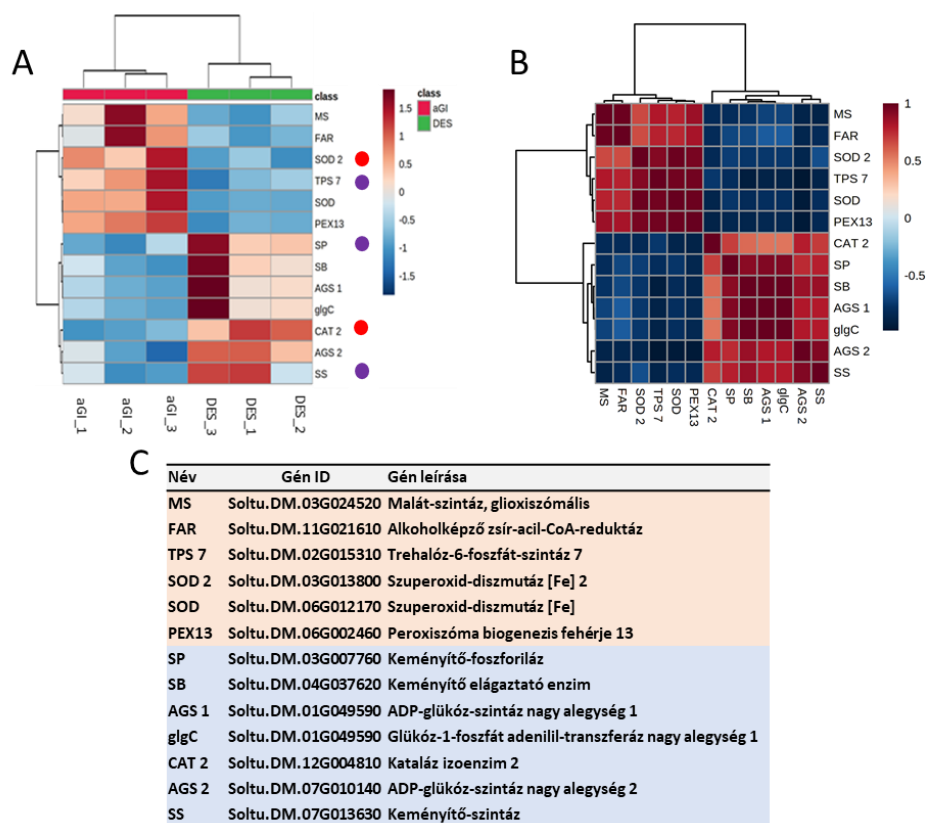


Név	Gén ID	Funkció
ANAC083	Soltu.DM.01G007500	Integrálja az ABA által közvetített abiotikus stressz jeleket, ami a levelek öregedéséhez vezet; részt vesz a xilém fejlődésében
bZIP44	Soltu.DM.01G049720	Magok csírázása
ANAC100	Soltu.DM.03G029980	Klorofill katabolikus folyamatok
NF-YA-1	Soltu.DM.10G028300	Átmenet a vegetatív fázisból a szaporodási fázisba, magfejlődés; mag nyugalmi állapotához vezető embriófejlődés
GATA21	Soltu.DM.12G025800	A GA jelátviteli útvonal represszora, ami elnyomja a virágzást és SOC1-függő módon modulálja a zöldülést; kloroplasztisz fejlődés
RAP2-7	Soltu.DM.11G025890	A virágzás és a veleszületett immunitás szabályozása; kölcsönhatásba lép a CRY2-vel a CO és FT szabályozása érdekében
ATHB-5	Soltu.DM.11G003380	Az ABA-aktivált jelátviteli útvonal szabályozása
TCP4	Soltu.DM.12G029960	Sziklevél, levél, embrió fejlődés, levelek öregedése
WRKY20	Soltu.DM.07G026960	Válasz 1-aminociklopropán-1-karbonsavra és sebzésre
CRF2	Soltu.DM.08G028690	Válasz ET-re és CK-ra
COL13	Soltu.DM.09G022940	CONSTANS-like 13
bHLH72	Soltu.DM.03G029660	De-etioláció; vörös, távoli vörös fény fototranszdukciója; válasz a fényingerekre
ERF1B	Soltu.DM.11G001310	ET és JA által közvetített jelátviteli útvonalak; kórokozók elleni védekezési reakció
ZAT10	Soltu.DM.12G006170	A növények védekezésének pozitív és negatív szabályozója
IBH1	Soltu.DM.09G016010	BR és GA által közvetített jelátviteli útvonalak; patogének elleni védekezés
WRKY11	Soltu.DM.08G002290	Védelmi válasz baktériumokra
GATA24	Soltu.DM.10G013010	Cink fehérje megkötés
MYB-Hv1	Soltu.DM.05G004710	Részt vehet az árpa flavonoid bioszintézisének szabályozásában
bHLH63	Soltu.DM.03G004150	A virágfejlődés pozitív szabályozása
NF-YB-3	Soltu.DM.07G027240	Virágzási idő szabályozása
REV1	Soltu.DM.03G019030	Reggeli fázisú TF, integrálja a cirkadián órát és az auxin jelátviteli útvonalakat
ABI5-like	Soltu.DM.04G033590	ABA és glükóz által közvetített jelátviteli útvonalak
ASR3	Soltu.DM.03G032480	Az immunválaszok negatív szabályozása
MYB1R-1	Soltu.DM.07G010910	A szárazság által szabályozott gének aktiválása
TGA2.1	Soltu.DM.10G026620	Fokozott tolerancia <i>Xanthomonas</i> -szal szemben

29. ábra: A 'Désirée'-től eltérően expresszáldó TF-ok az aGI52 levelekben. **(A)** Az aGI52 levelekben eltérően expresszáldó TF-ok a nem transzformált 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva. **(A)** Hőterkép **(B)** Korrelációs hőterkép **(C)** Génlista. A hormonok rövidítése: ABA, abszcizinsav; CK, citokinin; ET, etilén, BR, brassinoszteroid; GA, gibberellinsav; JA, jázminsav. Sárga pöttyel a virágfejlődéshez, zölddel a cirkadián órához, pirossal a stresszhez kapcsolódó TF-ok vannak jelölve.

A felfelé szabályozott kategóriába tartozott több TF is, többek között a bHLH63/CIB1, a virágfejlődés pozitív szabályozója (Liu et al. 2008) és a NF-YB-3/HAP3C, ami a CO-val kölcsönhatásba lépve elősegíti a virágzást az *Arabidopsis*-ban (Wenkel et al. 2006). De ide tartozott az IBH1 is, ami negatívan szabályozza a sejt- és szervmegnyúlást (Zhang et al. 2009),

az ABI5-like, ami hasonló az ABA kiváltotta növekedés- és virágzásgátlás fő közvetítőjéhez az *Arabidopsis*-ban (Lopez-Molina et al. 2001, Wang et al. 2013) és a REV1, ami a növény fejlődését befolyásoló órajel (Rawat et al. 2009). Ezen kívül a növényi védekezésben résztvevő TF-ok (pl. WRKY11, MYB1R1) is aktiválódtak (Jiang et al. 2016, Shin et al. 2011) az ASR3 mellett, ami negatív módon szabályozza az immungének expresszióját *Arabidopsis*-ban (Li et al. 2015). Érdekes, hogy az NF-YB-3/HAPC-3-val ellentétben, a HAP komplex DNS-kötő alegységet kódoló NF-YA-1/HAP2A gátlódott, akárcsak az etilénre reagáló TF, az APETALA 2 (AP2) doménnel rendelkező RAP2-7, aminek célgénjei virágzás represszorként működnek (Aukerman és Sakai 2003). Továbbá represszálódott a GATA21, a gibberellin jelátviteli útvonal represszora is, ami szintén gátolja a virágzást (Richter et al. 2010) és egy CONSTANS-like gén, a COL13 is, alacsonyabb szinten expresszálódott az aGI52-ben, mint a 'Désirée'-ben. A 29B ábra azt mutatja, hogy a 29C ábrán felsorolt TF-ok többségének expressziója erősen szinkronizált. Kivételek a ZAT10, ERF1B és a bHLH72, amelyek expressziós mintázata csak a TGA2.1, MYB1R-1 és az ASR3 expressziós mintázatához hasonló.



30. ábra: A glioxilát-és dikarboxilát anyagcsere, a szénhidrát anyagcsere és a peroxiszómális útvonalak aGI52 levelekben eltérően expresszálódó génjei a nem transzformált 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva. (A) Hőterkép (B) Korrelációs hőterkép (C) Génlista. Piros pöttyel a stresszhez, lilával a szénhidrát anyagcseréhez kapcsolódó TF-ok vannak jelölve.

A KEGG elemzés kiemelt néhány DEG-et, amelyek részt vesznek a glioxilát és dikarboxilát metabolizmusban, a szén anyagcserében és a peroxiszómális útvonalakban. Ezek

közé tartoznak a keményítőszintézis kulcsfontosságú enzimeit kódoló gének, az *AGS* (*ADP-GLUCOSE SYNTHASE*), *SS* (*STRACH SYNTHASE*) és a védekezésben szerepet játszó *SOD* (*SUPEROXIDE DISMUTASE*) vagy a *CAT* (*CATALASE*) (30A ábra). Mindazonáltal, míg a *SOD* aktiválódott, a *CAT* represszálódott (30A ábra). Ezzel szemben a keményítőszintézis gének gátlása erősen koordinált volt (30B ábra). A teljes génlista a 30C ábrán látható.

6.3.1. A transzkriptom elemzés eredményeinek megvitatása

A GI szerepét számos növényfajban vizsgálták és úgy tűnik, hogy a virágzási idő szabályozása és a cirkadián óra szabályozása a GI általános funkciója. Ezzel összhangban a burgonya *GI.04* génjének promóterében kimutattuk a virágfejlődés szabályozásában résztvevő TF-ok kötőhelyeit (lásd 6.2.1. fejezet), köztük a *SOC1* és az *ABI5* kötőhelyét, és RT-qPCR-rel a *GI.04* expresszióját a virágszervekben (Odgerel 2022). A transzkriptom elemzés kimutatta, hogy a *GI.04* gátlása befolyásolja a virágzás szabályozásában résztvevő számos TF kifejeződését. A *bHLH63/CIB1* és az *ABI5-like*, a virágzás pozitív szabályozói, aktiválódtak, míg a *RAP2-7* és a *GATA21* represszorok gátlódtak az aGI52 levelekben. A *COL13* (*CO-like* gén) azonban, ami az *Arabidopsis*-ban a virágzás aktivátora, kilóg a sorból, mivel alacsonyabb szinten expresszálódik az aGI52-ben, mint a 'Désirée'-ben, bár az is igaz, hogy a *COL13* szerepe még nem ismert, és akár el is térhet a *CO*-étől (Samach et al. 2000). A *GI.04* gátlása a *REVI* expressziójának növekedését idézte elő. A *REVI* összekapcsolja a cirkadián órát és az auxin hálózatokat az auxin bioszintetikus gén, a *YUCCA8* expressziójának pozitív szabályozásával és ezáltal elősegíti a növények növekedését (Rawat et al. 2009). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy más növényfajokhoz hasonlóan, a GI a burgonyában is részt vesz a cirkadián óra szabályozásában.

Az *Arabidopsis*-ban kimutatták, hogy az NF-Y/HAP komplex stimulálja a különböző gének transzkripcióját azáltal, hogy felismeri és kötődik a promóterek CCAAT motívumához. Az NF-Y komplexek többek között résztvesznek a virágzás, az embriogenezis, a magérés, a szárazságtűrés és az ABA-érzékelés szabályozásában. Bár, mind a *NF-YA-1/HAP2A*, mind a *NF-YB-3/HAP3C*, az NF-Y/HAP heterotrimer TF komplex komponenseit kódoló gének, az *NF-YA-1/HAP2A* gátlódott, míg az *NF-YB-3/HAP3C* az aGI52 levelekben aktiválódott. Az *Arabidopsis* genom 10 különböző NF-YA, NF-YB, NF-YC fehérjét kódol (Swain et al. 2017), de a tetraploid burgonyában az NF-Y gének száma akár nagyobb is lehet és a lefelé szabályozott *NF-YA-1/HAP2A*-nak és a felfelé szabályozott *NF-YB-3/HAP3C*-nek különböző alegységei is lehetnek.

A virágzás mellett a GI a növények környezeti stresszre adott válaszaiban is részt vesz. Védekezési mechanizmusban résztvevő, aktiválódott TF-okat azonosítottunk (*ERF1B*, *ZAT10*, *WRKY11*, *MYB1R1*, *TGA2.1*) az aGI52-ben. Kimutatták, hogy az *ERF1* és a *WRKY11* az *Arabidopsis*-ban és a paradicsomban a *Bacillus* fajaival szembeni tolerancia növekedéséhez

vezet (Lorenzo et al. 2003, Jiang et al. 2016), míg a *TGA2.1* aktivitása késlelteti a rizs növényeket a *Xanthomomas oryzae* elleni védekezésben (Fitzgerald et al. 2005).

A SOD és CAT antioxidáns enzimek a növények védekező mechanizmusainak szerves részei, azért, hogy elkerüljék az aktív oxigénfajták által okozott károkat. Érdekes módon azonban, míg a *SOD* felfelé szabályozott, a *CAT* lefelé szabályozott volt az aGI52 levelekben. A *GI* a *SOD* represszora az *Arabidopsis*-ban is, ahogy ezt a *gi-3* mutáns fokozott toleranciája is jelzi az oxidatív stresszel szemben, ami, legalább is részben, a *SOD* és *APX* gének konstitutív aktiválásával függ össze (Cao et al. 2006). A burgonyával ellentétben azonban a *CAT* gének expressziós szintje az *Arabidopsis*-ban 1,5–2-szer magasabb volt a *gi* mutánsokban, mint a vad típusban (Cha et al. 2019).

A keményítősintézis kulcsfontosságú génjei, az *AGS1*, *AGS2*, *SS* és *SP* gátlódtak, míg a *TPS*, egy cukorhírvivő, aktiválódott az aGI52-ben. Ismert, hogy az *Arabidopsis* cirkadián rendszere érzékeny a szacharózra, a *GI* fehérjét éjszaka a szacharóz stabilizálja, a *GI* mutánsok keményítőtartalma pedig megnő (Dalchau et al. 2011, Eimert et al. 1995, Haydon et al. 2017). Olyan rizsnövényekben, ahol a *GI*-re null mutáció mutatható ki, a levelekben szignifikánsan megnövekedett a szacharóz és a keményítőtartalom (Izawa et al. 2011). Transzkriptom eredményeink arra utalnak, hogy a burgonya lehet a harmadik olyan ismert növényfaj, amelyben a *GI.04* expresszió visszaszorítása csökkenti a levelek keményítőtartalmát. Egy közelmúltban végzett tanulmány a *TPS8*-at a *GI* közvetlen interaktoraként azonosította *Arabidopsis*-ban (Krahmer et al. 2018) és mi a *TPS7*-et a felfelé szabályozott gének között találtuk. Így tehát eredményünk alátámasztja azt a korábbi következtetést, hogy a *TPS* részt vesz a *GI* hatások közvetítésében.

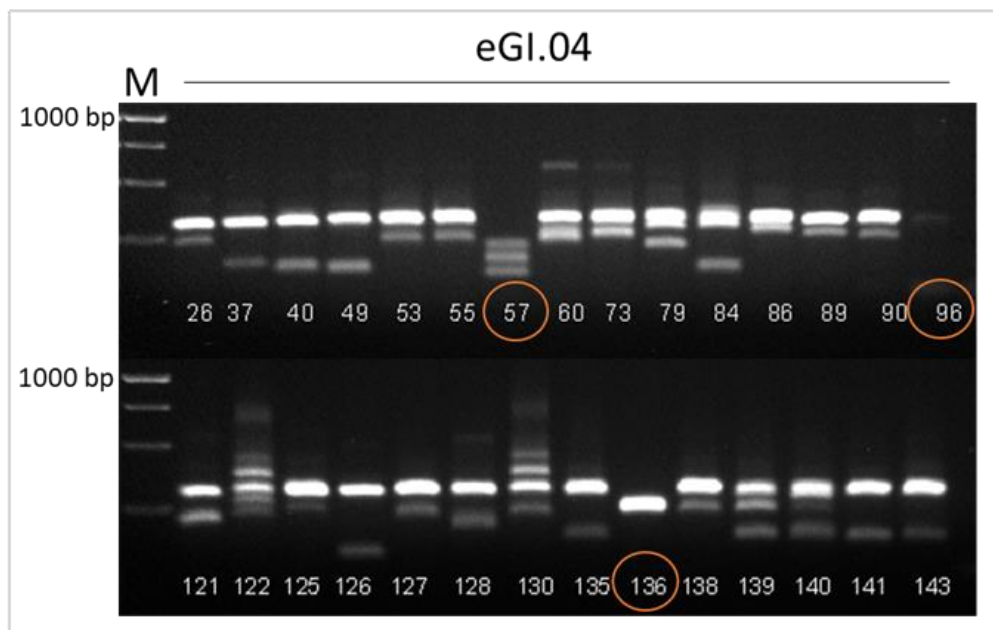
6.4. Az eGI mutánsok jellemzése

6.4.1. Az eGI.04 'Désirée' mutánsok izolálása és DNS szekvencia szintű jellemzése

A *GI.04* gén (33A ábra) burgonyában betöltött szerepének megismeréséhez CRISPR/Cas9 genomszerkesztés segítségével *GI.04* mutánsokat állítottunk elő a 'Désirée' kereskedelmi forgalomban lévő burgonyafajtából. A mutánsok előállítására egy olyan konstrukciót hoztunk létre, ami magában hordozta a Cas9-et és a gRNS-eket. A *GI.04* szekvenciájának nagy része azonos a *GI.12* szekvenciájával (7. melléklet), ezért a gRNS-eket (*GI04* gRNA1 FW és *GI04* gRNA2 R, 5. melléklet C) a *GI.04* gén 3' végének közelébe terveztük (7. melléklet), oda, ahol a legnagyobb volt a különbség a *GI.04* és a *GI.12* között.

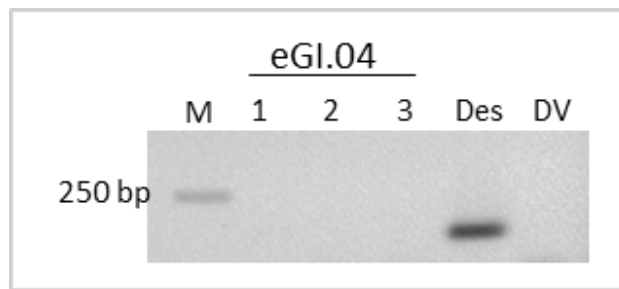
A konstrukciót 'Désirée'-be juttattuk és szelektív táptalajon regeneráltattuk a transzformánsokat. A mutációk keresésére genomi DNS-t izoláltunk a legyökerezett hajtásokból.

82 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük először a gGI04 test Fw és a gGI04 test R primer (5. melléklet E) kombinációval PCR segítségével. További primer (5. melléklet E) kombinációkat is kipróbáltunk és a PCR termékeket agaróz gélen megfuttatva szemmel is jól látható deléciókat kerestünk. 29 nagy deléciót hordozó mutáns vonalat kaptunk (31. ábra), melyeket GI.04 „end” mutánsoknak neveztünk el és eGI.04-nek rövidítettünk. A deléciók mérete és a fragmentumok száma alapján három mutáns vonalat választottunk ki a további vizsgálatokhoz (31. ábra, körrel jelölt vonalak).



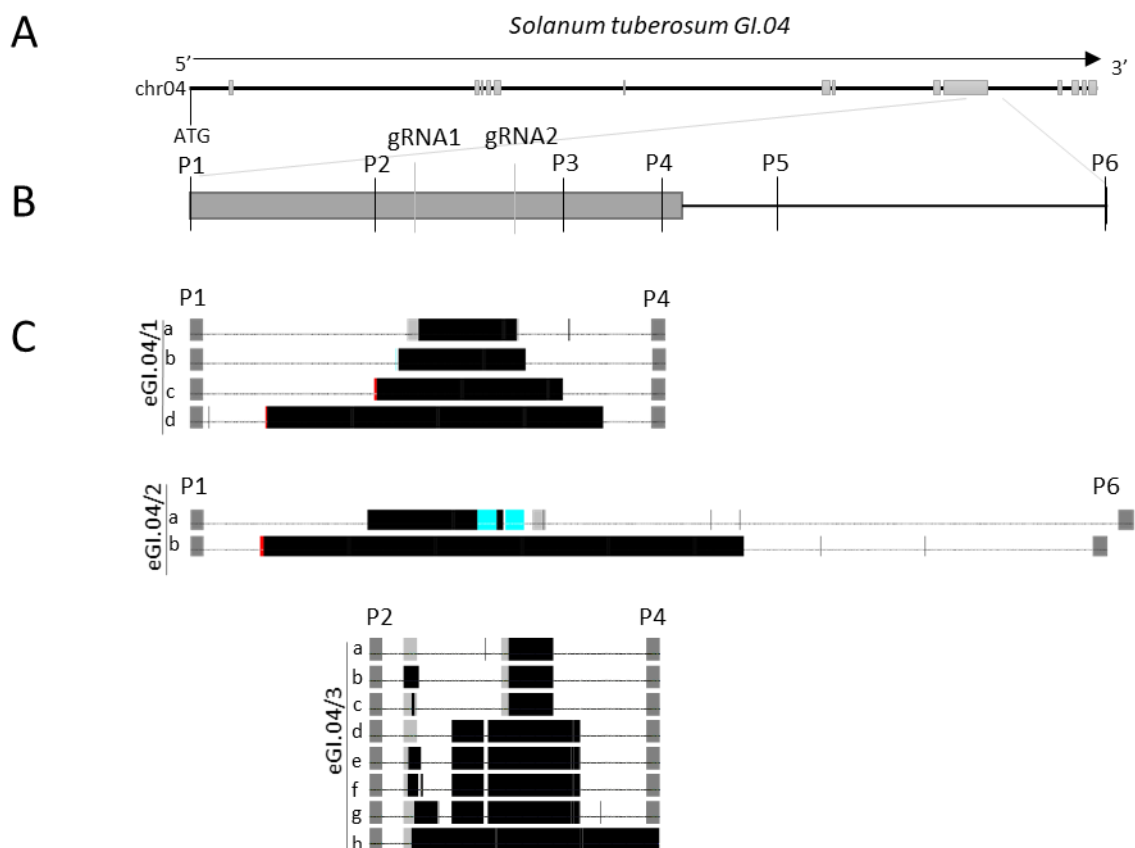
31. ábra: Az eGI.04 mutánsok azonosítása gGI04 test Fw és R primerekkel végzett PCR-rel és a PCR fragmentumok agaróz gélen történt szétválasztásával. M, marker; számok, a mutáns vonalak; narancssárga kör, a kiválasztott mutáns vonalak

A 'Désirée' tetraploid burgonyafajta. A kiválasztott három mutáns vonalról feltételeztük a gélek alapján (31. ábra), hogy null mutánsok, tehát mind a négy *GI.04* allélban deléciót hordoznak. Ennek bizonyítására a három mutáns DNS-ét a gRNS primerekkel (*GI04 gRNA1 Fw* és *GI04 gRNA2 R*, 5. melléklet C) is leteszteltük. Mivel PCR terméket egyik mutánsban sem kaptunk, mind a három kiválasztott mutánst null mutánsnak nyilvánítottuk (32. ábra). A továbbiakban eGI.04/1, eGI.04/2 és eGI.04/3 névvel fogunk rájuk hivatkozni.



32. ábra: Az eGI.04 mutánsok azonosítása GI04 gRNA1 Fw és GI04 gRNA2 R primer párral végzett PCR-rel. M, marker; 1, 2, 3, a kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll; DV, desztillált víz

A deléciók méretének és elhelyezkedésének meghatározására az eGI.04/1 vonal esetében a P1-P4, az eGI.04/2 esetében a P1-P6, az eGI.04/3 esetében pedig a P2-P4 primer párokkal (33B ábra, 5. melléklet E) kapott PCR fragmentumokat klónoztuk pGEM-T® Easy vektorba és megszekvenáltattuk. A kapott szekvenciákat a Spud DB-ben található *GI.04* genomszekvenciához hasonlítottuk.



33. ábra: A burgonya *GI.04* génjének vázlatos rajza és a deléciók elhelyezkedése a kiválasztott három eGI.04 mutánsban. (A) Vad típusú *GI.04*. chr04, 4. kromoszóma; ATG, translációs start

kodon; téglalapok, exonok **(B)** A 10. exon egy részének nagyított rajza a gRNS-ekkel és primerekkel. P1, GI04+2100 Fw; P2, gGI04 test Fw; P3, gGI04 test R; P4, GI04+2786 R; P5, GI04 del1 R; P6, GI04 del2 R; gRNA1, GI04 gRNA1 Fw; gRNA2, GI04 gRNA2 R. **(C)** A deléciók elhelyezkedése és mérete az eGI.04 mutáns vonalakban. A deléciókat a fekete téglalapok jelzik, a függőleges vonalak egy-egy bázispár különbségre utalnak. A primerek sötétszürke-, a gRNS-ek világosszürke téglalapok. Piros színnel azt a szekvencia részt emeltük ki, amelyik a deléció mindkét oldalára elhelyezhető. Kékkel a megduplázódott szekvencia rész van kiemelve; a-h betűk a különböző allélokot jelölik.

Az eGI.04 mutáns vonalakban különböző méretű és elhelyezkedésű deléciókat találtunk (33C ábra). Emellett több mutáns alléljában kaptunk 1-1 bázispár különbséget is a Spud DB-ben található *GI.04* szekvenciához hasonlítva. A kapott deléciók méretét a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: Az eGI.04 mutánsokban kapott deléciók mérete bázispárban

Vonal	Mutáns	a	b	c	d	e	f	g	h
eGI.04	1	146	189	276	499	-	-	-	-
	2	163 10	711			-	-	-	-
	3	67	23 67	5 67	48 137	19 48 137	3 16 48 137	35 48 137	370

Az eGI.04/1 vonalban egy 146 bázispáros, egy 189 bázispáros, egy 276 bázispáros és egy 499 bázispáros deléciót azonosítottunk. Megjegyezzük azonban, hogy két esetben a deléciót pontosan behatárolni nem tudtuk, mivel az eGI.04/1/c-ben egy GACA szekvencia darab, míg az eGI.04/1/d-ben egy TG szekvencia a deléció elé és után is elhelyezhető.

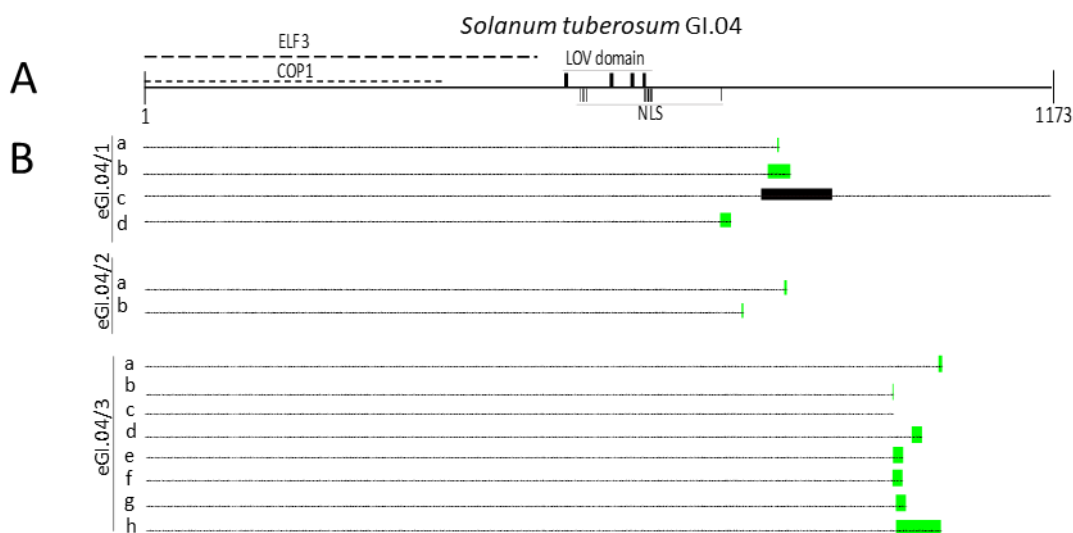
Az eGI.04/2/a-ban egy 163 és egy 10 bázispáros deléciót és egy szekvencia duplikációt azonosítottunk. Az eGI.04/2/b-ben egy 711 bázispáros deléciót találtunk és egy szekvencia darabot (CTGCA), ami a deléció elé vagy után is elhelyezhető. Bár számos klónt megszekvenáltattunk, több allél variációt eddig nem találtunk. Így valószínűnek tartjuk, hogy van olyan allél, amiben a CTGCA a deléció előtt és olyan is, amiben a deléció után helyezkedik el. De még így is kell lennie egy deléciónak, vagy átrendeződésnek eGI.04/2-ben, amit még nem találtunk meg.

Az eGI.04/3 mozaik növény. Az eGI.03/a-ban egy 67, az eGI.04/3b-ben egy 23 és egy 67, az eGI.04/3/c-ben egy 5 és egy 67, az eGI.04/3/d-ben egy 48 és egy 137, az eGI.04/3/e-ben

egy 19, egy 48 és egy 137, az eGI.04/3/f-ben egy 16, egy 3, egy 48 és egy 137, az eGI.04/3/g-ben egy 35, egy 48 és egy 137 és az eGI.04/3/h-ban egy 370 bázispáros deléciót azonosítottunk.

6.4.2. Az eGI.04 'Désirée' mutánsok fehérje szintű jellemzése

Kíváncsiak voltunk, hogy a deléciók mérete és elhelyezkedése mennyire befolyásolja a GI.04 fehérje aminosavsorrendjét. Az eredeti GI.04 fehérje 1173 aminosavból áll. Vázlatos rajza a 34A ábrán látható.



34. ábra: A vad típusú és az eGI.04 mutáns fehérjék vázlatos rajza. (A) Vad típusú GI.04 a funkcionális doménnel. Az ELF3 (EARLY FLOWERING 3) és a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) kötődési szakaszát a szaggatott vonalak jelzik, a LOV domént (light-oxygen-voltage domain) és az NLS-t (nucleus localisation signal) fekete téglalapok mutatják. A számok a fehérje első és utolsó aminosavára utalnak. (B) Az eGI.04 mutáns vonalak fehérjéi. A fekete kiemelés jelzi a deléció helyét és méretét, zöld színnel a megváltozott fehérje szekvencia látható, az a-h betűk a különböző allélokat jelölik.

Egy allél kivételével, minden deléció korai stophoz, a GI.04 fehérje megrövidüléséhez vezetett (34B ábra). Az eGI.04/1/a 822 aminosavra rövidült, amiből a két utolsó eltér az eredeti aminosavsorrendtől. Az eGI.04/1/b esetében 837 aminosavat kaptunk a stop kodonig a végén 29 eltérő aminosavval. Az eGI.04/1/c 1081 aminosavból állt, benne egy 29 aminosavnyi kieséssel a 799-ik aminosavtól. Az eGI.04/1/d esetében 759 aminosavat kaptunk a stop kodonig, aminek a végén 14 aminosav eltérés volt a vad típusú GI.04 fehérjéhez képest.

Az eGI.04/2/a 797 aminosavból állt, melynek végén 3 aminosav eltérés volt az eredeti aminosavsorrendtől. Az eGI.04/2/b 743 aminosavból állt, végén 2 aminosavból álló eltérés volt.

Az eGI.04/3/a 871 aminosavból állt, a végén 4 aminosav eltéréssel, míg az eGI.04/3/b 817 aminosav hosszú volt és csak az utolsó aminosavban tért el a vad típusú GI.04-tól. Az eGI.04/3/c 818

aminosavra rövidült. Az eGI.04/3/d 849 aminosavból állt, melynek a végén 11 aminosav eltérés volt. Az eGI.04/3/e és az eGI.04/3/f egyaránt 827 aminosavnyi volt, a végükön 11 aminosav eltéréssel. Az eGI.04/3/h 868 aminosav hosszú volt, melynek végén 49 aminosav eltért az eredeti aminosavsorrendtől.

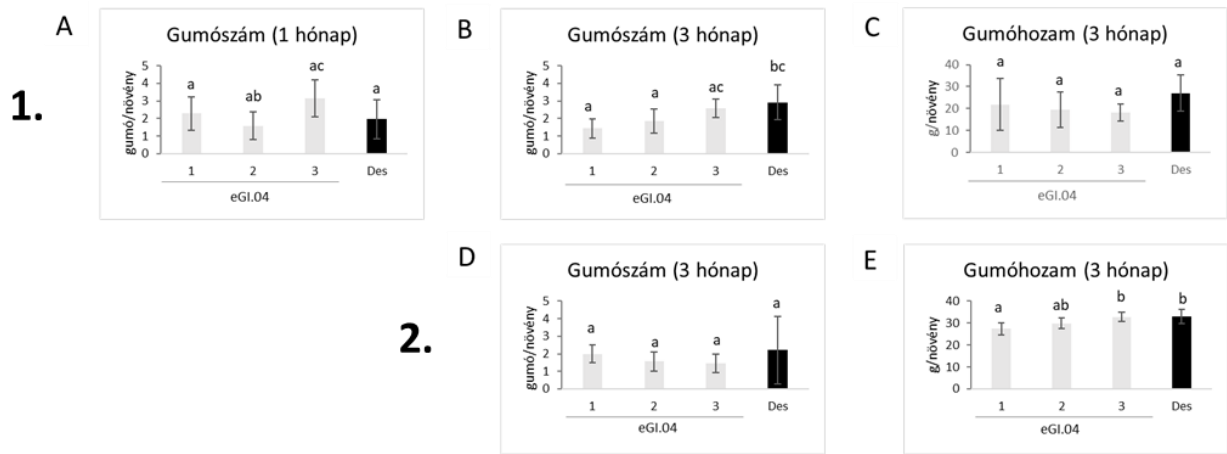
6.4.3. A GI.04 funkció vizsgálata üvegházi körülmények között

Az eGI.04 mutáns növények fenotípusát és gumóképzési tulajdonságait üvegházi körülmények között vizsgáltuk. A három kiválasztott eGI.04 mutáns vonalból az első kísérlet alkalmával 7, a második kísérlet alkalmával 9 vegetatívan szaporított, 4-hetes egyedet ültettünk ki cserepekbe, amelyek steril földdel voltak megtöltve, és üvegházi körülmények között, természetes fényviszonyok mellett neveltük tovább a növényeket. Kontrollként mind a két esetben nem transzformált 'Désirée' növényeket használtunk ugyanannyi mennyiségben.

Az első kísérlet alkalmával megbecsültük a gumófejlődés koraiságát, amihez megszámláltuk az egy hónapos növények gumóit, majd visszaültettük a növényeket a cserépbe és tovább neveltük őket az üvegházban. Az átlagos gumószámok a következő módon alakultak: eGI.04/1 növényeken $2,3 \pm 1$, az eGI.04/2 növényeken $1,6 \pm 0,8$, az eGI.04/3 növényeken $3,1 \pm 1,1$ gumó volt. A kontroll növényeken átlagosan $2,0 \pm 1,1$ gumó volt. Szignifikánsan egyik vonal sem tért el a kontrolltól, viszont az eGI.04/2 vonal gumószáma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az eGI.04/3 vonalé (35A ábra).

A vegetációs időszak végén újra megszámláltuk a gumókat. Ekkor átlagosan az eGI.04/1 növényeken $1,4 \pm 0,5$, az eGI.04/2 növényeken $1,9 \pm 0,7$, az eGI.04/3 növényeken $2,6 \pm 0,5$, míg a 'Désirée' kontroll növényeken $2,9 \pm 1$ gumó volt. A gumószámoláskor megállapítottuk, hogy a visszaültetés során valószínűleg leszakadtak gumók az eGI.04/1 és az eGI.04/3 növényekről, mivel kevesebb gumót találtunk rajtuk, mint két hónappal azelőtt. A gumók száma az eGI.04/1 és az eGI.04/2 mutánsokon szignifikánsan kevesebb volt, mint a kontroll növényeken (35B ábra).

A gumóhozam megállapítására mind a mutáns növényeken, mind a kontroll növényeken fejlődött gumók tömegét lemértük a vegetációs időszak végén. Az eGI.04/1 növényeken átlagosan $21,9 \pm 11,8$, az eGI.04/2 növényeken $19,5 \pm 8$, az eGI.04/3 növényeken $18,2 \pm 3,9$, a kontroll növényeken $26,9 \pm 8,3$ g/növény volt a gumóhozam. Szignifikáns eltérést egyik vonal esetében sem kaptunk (35C ábra).

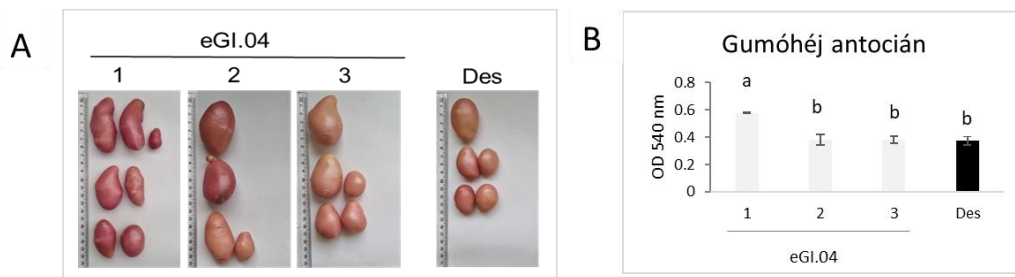


35. ábra: Az eGI.04 mutánsok gumószáma és hozama a 'Désirée'-hez viszonyítva két kísérletben (A-C és D-E). (A) Gumószám a gumófejlődés kezdeti stádiumában. (B és D) Gumószám a vegetációs időszak végén. (C és E) Gumóhozam a vegetációs időszak végén. A számok a kísérletek számát jelölik.

A második kísérlet alkalmával a vegetációs időszak elején nem becsültük meg a gumófejlődés koraiságát, mivel az első kísérletben nem kaptunk szignifikáns különbséget a mutánsok és a 'Désirée' között, de a vegetációs időszak végén felszedtük a gumókat, megszámloltuk és megmértük őket. Az átlagos gumószámok a következők voltak: eGI.04/1 növényeken $2,0 \pm 0,5$, az eGI.04/2 növényeken $1,6 \pm 0,5$, az eGI.04/3 növényeken $1,4 \pm 0,5$, a kontroll 'Désirée' növényeken $2,2 \pm 1,9$ gumó/növény volt. Ellentétben az első kísérlettel, most egyik mutáns gumószáma sem tért el a kontroll gumószámától a vegetációs időszak végén (35D ábra). A gumótömeg mérés alapján az eGI.04/1 növényeken átlagosan $27,4 \pm 2,9$, az eGI.04/2 növényeken $29,9 \pm 2,6$, az eGI.04/3 növényeken $32,7 \pm 2,1$, míg a kontroll növényeken átlagosan $33 \pm 3,4$ g/növény volt a gumóhozam. Míg az első kísérletben a gumóhozamban szignifikáns eltérés nem volt, a második kísérletben az eGI.04/1 vonal gumóhozama szignifikánsabb alacsonyabb volt, mint a kontrollé és az eGI.04/3 vonalé (35E ábra).

6.4.3.1. Az eGI.04 mutáns vonalak gumóhéjának antocián tartalma

Mint ahogy azt már a 6.2.2.1. fejezetben is leírtuk, a 'Désirée' egy piros héjú burgonyafajta, aminek színét az antociánok adják. Szemmel láthatóan az eGI.04/1 és az eGI.04/2 gumók, bár eltérő mértékben, de sötétebbnek tündek, mint a 'Désirée' gumói (36A ábra). Az eGI.04/3 gumók színe nem tért el a kontrollétól. Az antocián tartalom mérés megerősítette, hogy az eGI.04/1 gumók héjszíne valóban intenzívebb, mint a kontrollé. Az eGI.04/2 és az eGI.04/3 gumóhéjak antocián tartalma viszont nem tért el szignifikánsan a kontrollétól (36B ábra).

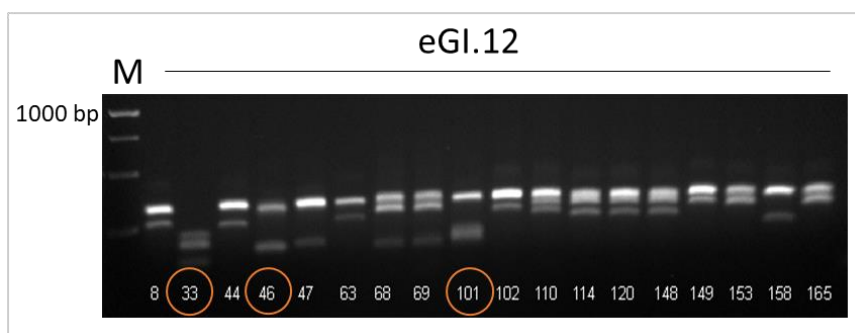


36. ábra: Az eGI.04 mutáns vonalak gumói és a gumóhéjainak antocián tartalma a kontroll 'Désirée'-hez viszonyítva. (A) eGI.04 és 'Désirée' gumók. (B) A gumóhéjak antocián tartalma

6.4.4. Az eGI.12 'Désirée' mutánsok izolálása és DNS szekvencia szintű jellemzése

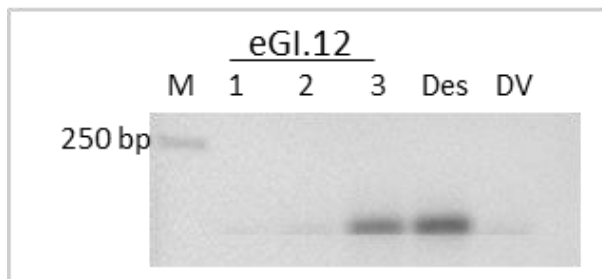
A burgonyában a *GI.12* (39A ábra) szerepének megismeréséhez, akár csak a *GI.04* esetében, a CRISPR/Cas9 genomszerkesztés segítségével *GI.12* mutánsokat állítottunk elő a 'Désirée' burgonyafajtából. A gRNS-eket is, a *GI.04*-hez hasonlóan, a *GI.12* 3' végéhez közeli (7. melléklet), a *GI.04*-től leginkább eltérő régiójára terveztük (GI12 gRNA1 Fw és GI12 gRNA2 R, 5. melléklet F).

A konstrukciót 'Désirée'-be juttattuk, ezután szelektív táptalajon regeneráltattuk a transzformánsokat. A mutációk keresésére genomi DNS-t izoláltunk a legyökerezett hajtásokból. 86 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük PCR segítségével a gGI12 test Fw és a gGI12 test R primer (5. melléklet H) kombinációval. 18 olyan mutáns vonalat kaptunk, amiben agaróz gélen szemmel is jól látható méretű deléción volt (37. ábra). Ezeket *GI.12* „end” mutánsoknak neveztük el és eGI.12-nek rövidítettük. A deléción mérete és a fragmentumok száma alapján a 37. ábrán körrel jelölt három mutáns vonalat választottuk ki a további vizsgálatokra.



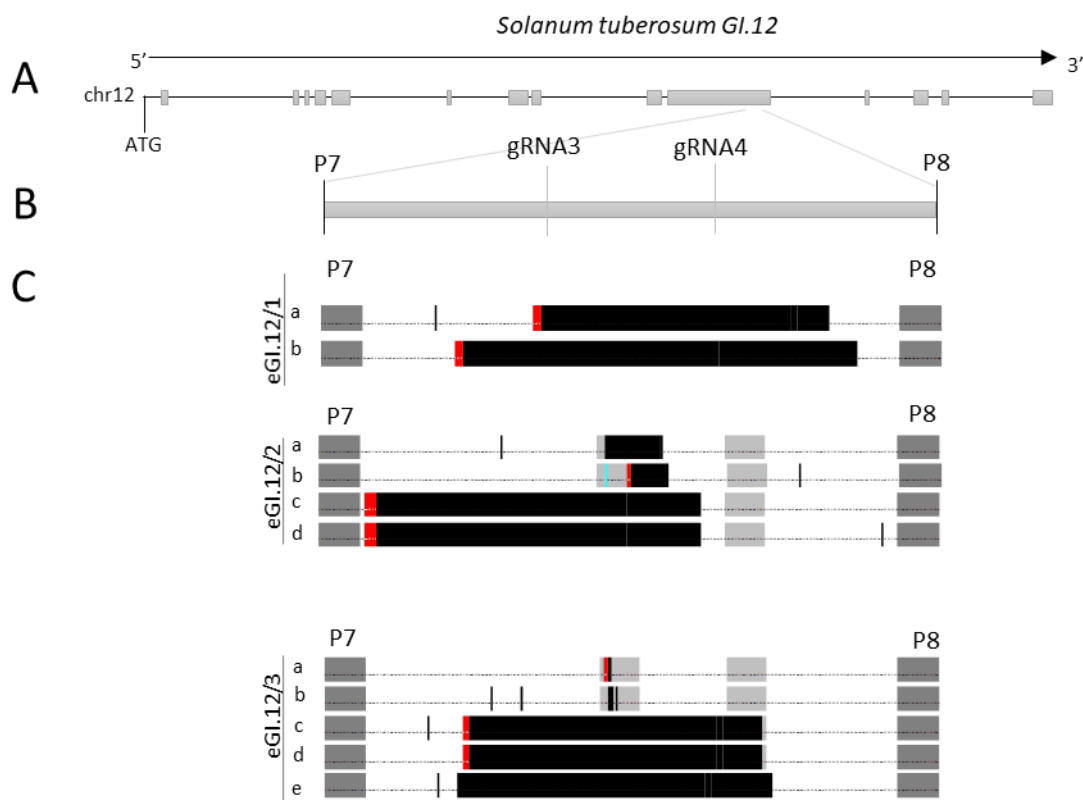
37. ábra: Az eGI.12 mutánsok azonosítása gGI12 test Fw és R primerekkel végzett PCR-rel és a PCR fragmentumok agaróz gélen történt szétválasztásával. M, marker; számok, a mutáns vonalak; narancssárga kör, a kiválasztott mutáns vonalak

A három eGI.12 mutáns vonalat a gRNS primerekkel (GI12 gRNA1 Fw és GI12 gRNA2 R; 5. melléklet F) végzett PCR-rel is leteszteltük. Megállapítottuk, hogy a három mutáns vonalból kettő nagy valószínűséggel null mutáns, míg a harmadik vonalban feltételezhetően nincs mindegyik allélban mutáció (38. ábra). A továbbiakban a három kiválasztott vonalra eGI.12/1, eGI.12/2 és eGI.12/3 névvel fogunk hivatkozni.



38. ábra: Az eGI.12 mutánsok azonosítása GI12 gRNA1 Fw és GI12 gRNA2 R primerekkel végzett PCR-rel. M, marker; 1, 2, 3, kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll; DV, desztillált víz

A deléciók méretének és elhelyezkedésének meghatározására az eGI.12 vonalokból a gGI12 test Fw és R primerekkel kapott PCR fragmentumokat (39B ábra) klónoztuk pGEM[®]-T Easy vektorba és megszekvenáltattuk. A kapott szekvenciákat a Spud DB-ben található *GI.12* genomszekvenciához hasonlítottuk.



39. ábra: A burgonya *Gl.12* génjének vázlatos rajza és a deléciók elhelyezkedése a kiválasztott három eGI.12 mutánsban. (A) Vad típusú *Gl.12*. chr12, 12. kromoszóma; ATG, transzlációs start kodon; téglalapok, exonok. (B) A 10. exon egy részének nagyított rajza a gRNS-ekkel és primerekkel. P7, gGI12 test Fw; P8, gGI12 test R; gRNA3, GI12 gRNA1 Fw; gRNA4, GI012 gRNA2 R. (C) A deléciók elhelyezkedése és mérete az eGI.12 mutáns vonalakban. A deléciókat a fekete téglalapok jelzik, a függőleges vonalak egy-egy bázispár különbségre utalnak. A primerek sötétszürke-, a gRNS-ek világosszürke téglalapok. Piros színnel azt a szekvencia részt emeltük ki, amelyik a deléció mindkét oldalára elhelyezhető. Kékkel a megduplázódott szekvencia rész van kiemelve; a-e betűk a különböző allélokat jelölik.

Akárcsak az eGI.04 mutánsokban, az eGI.12 mutánsokban is különböző méretű és elhelyezkedésű deléciókat, és ezen kívül, egy-egy bázispárnyi eltérést kaptunk a vad típusú szekvenciához viszonyítva (39C ábra). A kapott deléciók méretét a 4. táblázat foglalja össze.

4. táblázat: Az eGI.12 mutánsokban kapott deléciók mérete bázispárban

Vonal	Mutáns	a	b	c	d	e
eGI.12	1	144	197			-
	2	28	19	162	162	-
	3	2	3	148	148	159

Az eGI.12/1-ben az egyik allélban egy 144, a másikban egy 197 bázispáros deléciót azonosítottunk. Az egyik esetben egy AATT, a másik esetben egy TGCT szekvencia darab a

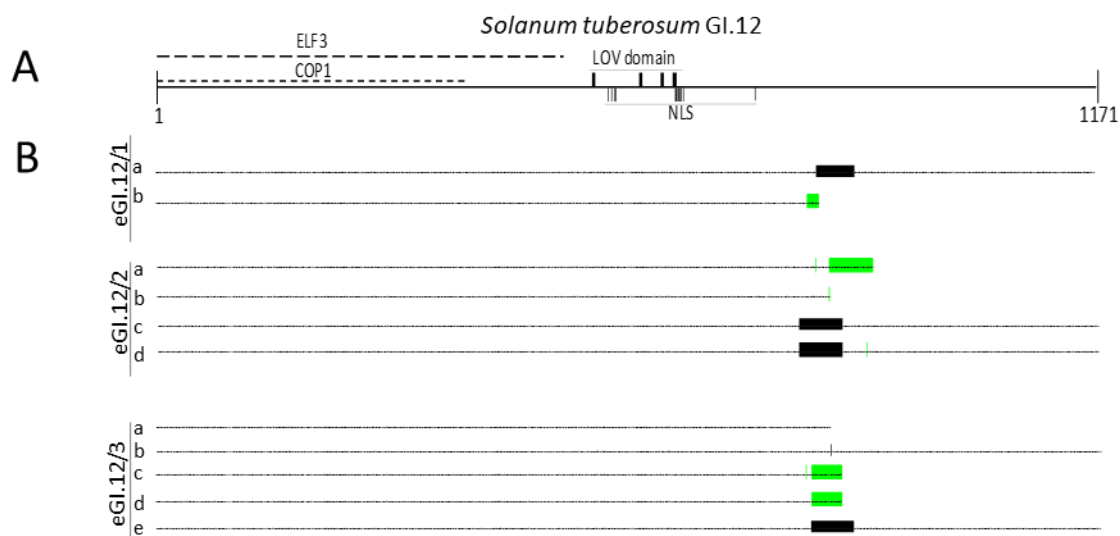
deléció elé és után is helyezhető. Mivel az eGI.12./1-ből más szekvenciájú fragmentumot nem tudtunk klónozni és a gRNS primerekkel végzett PCR szerint az eGI.12/1 egy null mutáns, elképzelhető, hogy mind a 144, mind pedig a 197 bázispáros delécióból létezik olyan variáció, amiben az AATT, illetve a TGCT szekvencia darab az egyik allélban a deléció előtt, a másikban a deléció után helyezkedik el.

Az eGI.12/2/a-ban egy 28 bázispáros, az eGI.12/2/b-ben egy 19 bázispáros deléciót azonosítottunk, és ezen kívül egy CT szekvencia darabot, ami két helyre is illeszthető, valamint egy T bázis addíciót. Az eGI.12/c esetében egy-egy 162 bázispáros deléciót azonosítottunk, emellett egy AAGCTT szekvencia darabot, ami a deléció elé és után is illeszthető. Ezen kívül az eGI.12/2/c és eGI.12/2/d szekvencia között egy G bázis különbség is található. Így tehát lehetséges, hogy a 162 bázispáros deléció két különböző allélt is érint.

Az eGI.12/3/a esetében egy 2 bázispáros deléciót azonosítottunk és egy GT szekvencia darabot, ami két helyre is illeszthető. Mindkét változás érinti a gRNA3 szekvenciát. Az eGI.12/3/b-ban egy 3 bázispáros deléciót találtunk a gRNA3-ban. Az eGI.12/3/c-ben és az eGI.12/3/d-ben egy-egy 148 bázispáros deléciót azonosítottunk és egy TTG szekvencia darabot, ami két helyre is illeszthető. Az eGI.12/3/c és az eGI.12/3/d közötti eltérést egy G bázis jelenti. Az eGI.12/3/e-ben egy 159 bázispáros deléciót azonosítottunk. Mivel az eGI.12/3-ban minimum 5 féle mutáns allél van, de ha figyelembe vesszük, hogy két esetben néhány bázispár, akár a deléció elé vagy mögé is rakható, akkor akár 7 féle mutáns allélunk is lehet. Az viszont biztos, hogy az eGI.12/3 növények, akár csak az eGI.04/3 növények, mozaikok, de ellentétben az eGI.04/3-mal, nem null mutánsok, vagyis valószínűleg van még bennük egy vad típusú allél is (38. ábra).

6.4.5. Az eGI.12 'Désirée' mutánsok fehérje szintű elemzése

Az eredeti GI.12 fehérje 1171 aminosavból áll és vázlatos rajza a 40A ábrán látható.



40. ábra: A vad típusú és eGI.12 mutáns fehérjék vázlatos rajza. **(A)** Vad típusú GI.12 a funkcionális doménekkal. Az ELF3 (EARLY FLOWERING 3) és a COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORHOGENIC 1) kötődési szakaszát a szaggatott vonalak jelzik, a LOV domént (light-oxygen-voltage domain) és az NLS-t (nucleus localisation signal) fekete téglalapok mutatják. A számok a fehérje első és utolsó aminosavára utalnak. **(B)** Az eGI.12 mutáns vonalak fehérjéi. Fekete kiemelés jelzi a deléció helyét és méretét, zöld színnel a megváltozott fehérje szekvencia látható, az a-e betűk a különböző allélokat jelölik.

Az eGI.12/1/a 1123 aminosavból áll, melyben a 825-ik aminosavtól egy 48 aminosav hosszúságú deléció van. Az eGI.12/1/b 827 aminosavból áll, a végén 15 aminosav eltérés van az eredeti fehérje aminosavsorrendjéhez képest (40B ábra).

Az eGI.12/2/a 891 aminosavból áll, melyben a 820-ik aminosav, illetve a végén 55 aminosav is eltér a vad típusától. Az eGI.12/2/b 837 aminosavból áll, melynek végén 1 aminosav más, mint a vad típusban. Az eGI.12/2/c 1117 aminosavból áll, melyből a 799-ik után 54 aminosav hiányzik, majd folytatódik az eredeti aminosavsorrenddel. Az eGI.12/2/d 1117 aminosavból áll, melyből hiányzik, az eGI.12/2/c-hez hasonlóan, a 799-ik aminosavtól 54 aminosav, majd visszaáll az eredeti aminosavsorrend, de a 883-ik aminosava más, mint az eredeti (40B ábra).

Az eGI.12/3/a 836 aminosavból áll. Az eGI.12/3/b 1170 aminosav hosszú, melyből a 837-ik aminosav kiesett. Az eGI.12/3/c 851 aminosavból áll, melynek a 807-ik aminosava eltérő, illetve a végén 38 aminosav más. Az eGI.12/3/d 851 aminosavból áll, a végén 38 aminosav más, mint a vad típusban. Az eGI.12/3/e 1118 aminosav hosszúságú, melyben a 813-ik aminosavtól 53 aminosav kiesett, de ezt követően visszaállt az eredeti aminosavsorrend (40B ábra).

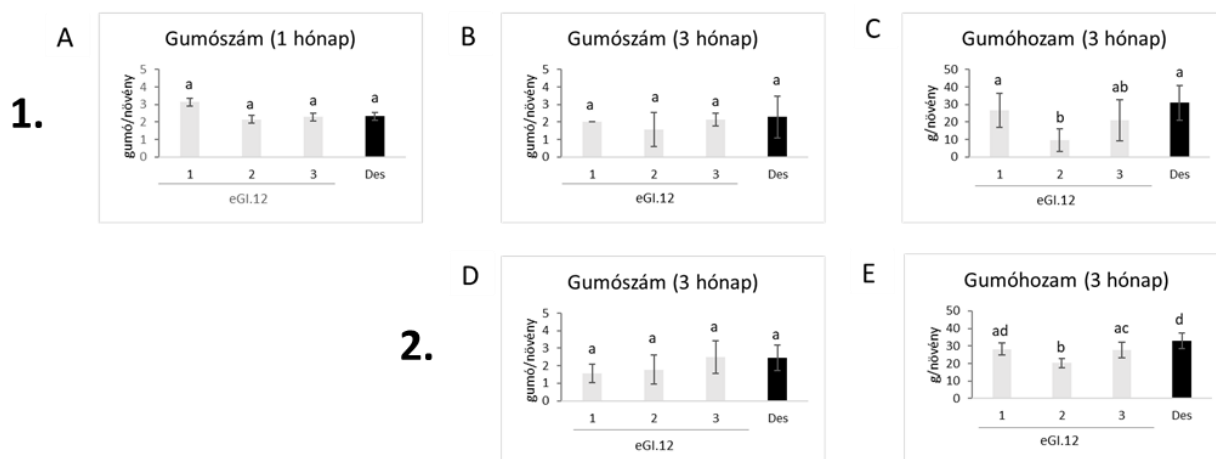
6.4.6. A GI.12 funkció vizsgálata üvegházi körülmények között

Akárcsak az eGI.04 mutánsokból, az eGI.12 mutánsokból is 4-hetes vegetatívan szaporított egyedeket ültettünk ki, természetes fényviszonyok mellett, üvegházi körülmények közé. Az első kísérlet alkalmával 7, a második kísérlet alkalmával 9 növényt neveltünk mutáns vonalanként a 'Désirée' kontrollal együtt.

Egy hónap után az eGI.12/1 növényeken átlagosan $3,1 \pm 0,9$, az eGI.12/2 növényeken $2,1 \pm 1,6$, az eGI.12/3 növényeken $2,3 \pm 1,3$, a kontroll 'Désirée' növényeken $2,3 \pm 1,1$ gumó volt. Szignifikáns különbséget nem kaptunk egyik vonal esetében sem a kontrollhoz viszonyítva (41A ábra).

A vegetációs időszak végén újra megszámloltuk a gumókat. Az első kísérletben az eGI.12/1 növényeken átlagosan $2,0 \pm 0$, az eGI.12/2 növényeken $1,6 \pm 1$, az eGI.12/3 növényeken $2,1 \pm 0,4$, míg a kontrollon $2,3 \pm 1,2$ gumó volt. Szignifikáns különbséget nem találtunk a kontrollhoz viszonyítva egyik vonalnál sem (41B ábra).

A gumóhozam megállapítására az üvegházi növényeken fejlődött gumókat lemértük. A gumóhozam (g/növény) a következőképpen alakult: az eGI.12/1 növényeken $26,7 \pm 9,7$, az eGI.12/2 növényeken $9,5 \pm 6,5$, az eGI.12/3 növényeken $20,8 \pm 11,8$, a kontroll növényeken $31 \pm 9,8$. Az eGI.12/2 mutánsnak szignifikánsan alacsonyabb volt a gumóhozama, mint a 'Désirée'-nek (41C ábra).



41. ábra: Az eGI.12 mutánsok gumószáma és hozama a 'Désirée'-hez viszonyítva két kísérletben (A-C és D-E). (A) Gumószám a gumófejlődés kezdeti stádiumában. (B és D) Gumószám a vegetációs időszak végén. (C és E) Gumóhozam a vegetációs időszak végén. A számok a kísérletek számát jelölik.

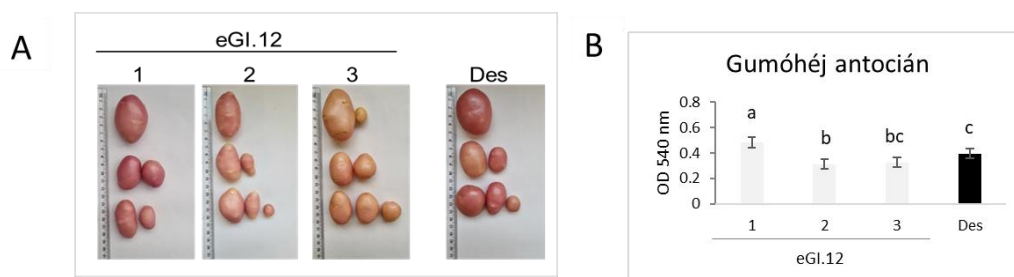
Mivel az első kísérletnél a gumófejlődés koraiságának becslésekor nem kaptunk szignifikáns különbséget az eGI.12 mutánsok és a kontroll között, így a második kísérletben csak

a vegetációs időszak végén számoltuk meg a gumókat. Az átlagos gumószám a következő volt: az eGI.12/1 növényeken $1,6 \pm 0,5$, az eGI.12/2 növényeken $1,8 \pm 0,8$, az eGI.12/3 növényeken $2,5 \pm 0,9$, a kontroll növényeken $2,4 \pm 0,7$ gumó volt. Hasonlóan az első kísérlethez, a kontrollhoz viszonyítva most sem kaptunk szignifikáns különbséget egyik vonal esetében sem (41D ábra).

A mutáns növényeken és a kontroll növényeken fejlődött gumókat a gumószám megállapítása után lemértük. Az eGI.12/1 növényeken átlagosan $28,3 \pm 3,5$, az eGI.12/2 növényeken $20,3 \pm 2,7$, az eGI.12/3 növényeken $27,7 \pm 4,4$, míg a kontroll növényeken $32,9 \pm 4,5$ g/növény volt a gumóhozam. Szignifikáns különbséget találtunk több vonal esetében is. A második kísérletben nemcsak az eGI.12/2, de az eGI.12/3 vonal gumóhozama is szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollé (41E ábra).

6.4.6.1. Az eGI.12 mutáns vonalak gumóhéjának antocián tartalma

Szemmel az eGI.12/1 gumók sötétebbnek, míg az eGI.12/2 gumók világosabbnak tűntek, mint a 'Désirée' gumók (42A ábra). Az antocián tartalom mérés ezt megerősítette. Az eGI.12/1 gumók héjának antocián tartalma szignifikánsan magasabb, míg az eGI.12/2-é szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrolloké (42B ábra).



42. ábra: Az eGI.12 mutáns vonalak gumói és gumóhéjainak antocián tartalma a kontroll 'Désirée'-hez viszonyítva. (A) eGI.12 és 'Désirée' gumók. (B) A gumóhéjak antocián tartalma

6.5. mGI mutánsok jellemzése

6.5.1. mGI mutánsok izolálása

Mint ahogy azt az előző fejezetben bemutattuk, a 'Désirée' *GI* génjeinek végére tervezett gRNS-ekkel kapott mutánsok nem mutattak lényeges eltérést a vadtypushoz képest. Ezért újabb mutánsokat hoztunk létre. Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a *GI* fehérje N terminálisához két TF, a virágzást befolyásoló ELF3 és a fotomorfogenezisben szerepet játszó COP1 is kötődik (Yu et al. 2008). A *GI.04* és a *GI.12* 5' végének nagyfokú hasonlósága miatt azonban erre a részre nem tudtunk allél specifikus gRNS-eket tervezni. A *GI* fehérje középső részén helyezkedik el az úgynevezett LOV domén, amihez három fotoreceptor, a ZTL, LKP2 és

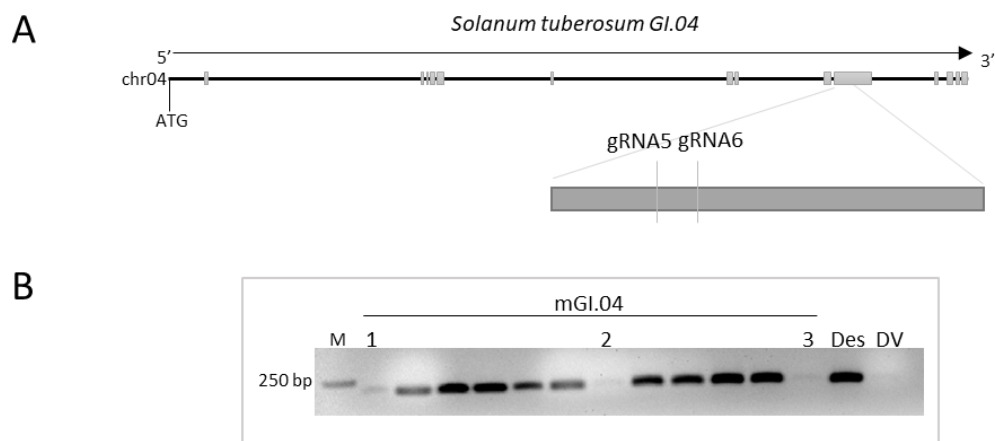
az FKF1 is kötődni képes (Kwon et al. 2022). Mindemellett ismert volt az is, hogy a GI nemcsak a citoplazmában, de a sejtmagban is kimutatható (Kim et al. 2013) és az ezt lehetővé tevő ún. „nucleus localisation signal” (NLS), a LOV domén közelében helyezkedik el (Huq et al. 2000). Ezért megpróbáltuk ezt a középső részt megcélolni és „middle” (mGI) mutáns vonalakat létrehozni a CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló mutagenézissel. Ehhez *GI.04* és *GI.12* specifikus gRNS-eket terveztünk, de megpróbáltuk mindkét gént is egyszerre eltalálni a gRNS-ek egyszerre történő bevitelével a 'Désirée'-be ko-transzformáció segítségével. Az így kapott *GI.04* mutáns vonalakat mGI.04-nek, a *GI.12* mutáns vonalakat mGI.12-nek és a mindkét *GI*-re is mutáns vonalakat mGI.4/12-nek neveztük el.

Két-két gRNS-t klónoztunk be a pKSE401 vektorba az mGI.04 és az mGI.12 konstrukciók létrehozására. A konstrukciókat 'Désirée'-be transzformáltuk. Szelektív táptalajon regeneráltattuk a növényeket, majd a megnőtt, legyökerezett hajtásokból genomi DNS-t izoláltunk. Az mGI.04 esetében 148, az mGI.12 esetében 22, az mGI.4/12 esetében 108 feltételezett mutáns növény genomi DNS-ét teszteltük a gRNS-ek primereinek kombinációival (gRNS 5-8, 5. melléklet C és F). Az előző fejezetekben már említettük, hogy a 'Désirée' tetraploid burgonyafajta, ezért az mGI.04 és az mGI.12 esetében is, csak olyan mutánsokra koncentráltunk, ahol mind a négy allélban keletkezett mutáció, tehát null mutánsok (5. táblázat).

5. táblázat: Az mGI mutánsok száma [db]

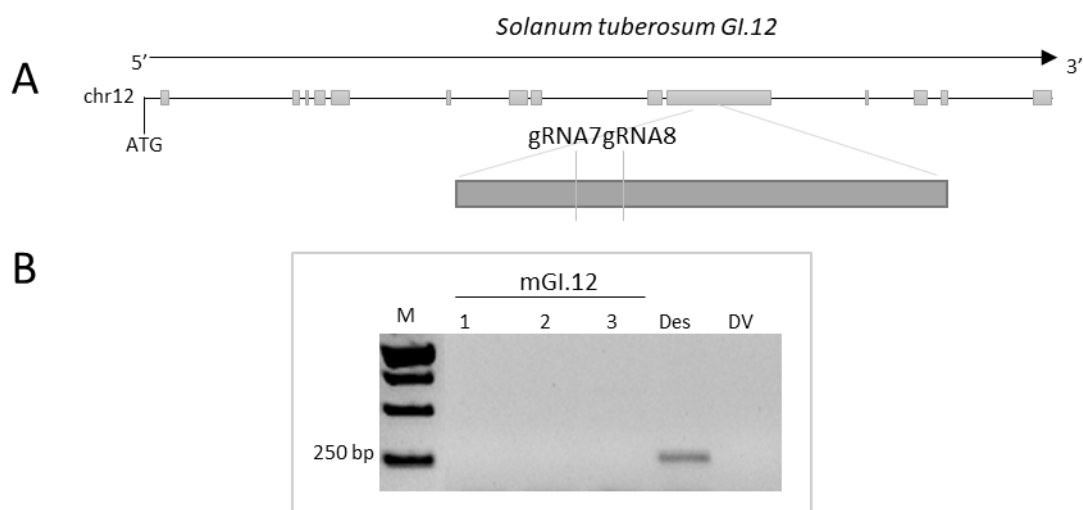
Mutáns	Tesztelt növények száma	<i>GI.04</i>-re null mutáns	<i>GI.12</i>-re null mutáns	<i>GI.04</i>-re mutáns	<i>GI.12</i>-re mutáns
mGI.04	148	3	-	-	-
mGI.12	22	-	14	-	-
mGI.4/12	108	5	17	6	2

Az mGI.04 esetében három null mutánst találtunk, amikre a későbbiekben mGI.04/1, mGI.04/2 és mGI.04/3 névvel fogunk hivatkozni. A burgonya *GI.04* génjének vázlatos rajza (43A ábra) alatt, a 43B ábrán, az a gélkép látható, aminek alapján kiválasztottuk a három null mutánst.



43. ábra: A burgonya *GI.04* génjének vázlatos rajza és az mGI.04 null mutánsok azonosítása.
 (A) A burgonya *GI.04* génjének vázlatos rajza és a 10. exon egy részének nagyított képe a primerként is használt gRNS-ekkel. chr04, 4. kromoszóma; ATG, translációs start kodon; téglalapok, exonok (B) Az mGI.04 mutánsok azonosítása GI04 gRNA393 Fw és GI04 gRNA594 R primerekkel végzett PCR-rel és a PCR fragmentumok agaróz gélen történt szétválasztásával.
 M, marker; számok, a mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll; DV, desztillált víz

Az mGI.12 mutánsok azonosítása hasonlóan történt, mint az mGI.04 mutánsoké, csak itt a GI12 gRNA591 Fw és GI12 gRNA799 R primereket (44A ábra) használtuk. A PCR terméket agaróz gélen megfuttatva 14 null mutánsot találtunk, amiből szintén hármat választottunk ki a további vizsgálatokhoz (44B ábra). Ezeket mGI.12/1, mGI.12/2 és mGI.12/3-nak neveztük el.



44. ábra: A burgonya *GI.12* génjének vázlatos rajza és a három kiválasztott mGI.12 null mutáns gélképe. (A) A burgonya *GI.12* génjének vázlatos rajza és a 10. exon egy részének nagyított képe a primerként is használt gRNS-ekkel. chr12, 12. kromoszóma; ATG, translációs start kodon; téglalapok, exonok (B) Az mGI.12 mutánsok azonosítása GI12 gRNA591 Fw és GI12 gRNA799 R primerekkel végzett PCR-rel és a PCR fragmentumok agaróz gélen történt

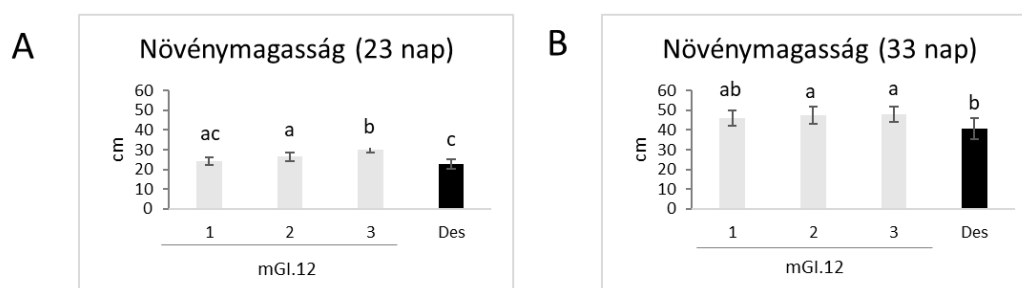
szétválasztásával. M, marker; számok, a kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll; DV, desztillált víz

Megpróbáltunk létrehozni olyan mutáns vonalakat is, amelyek mindkét *GI* génre null mutánsok. Bár olyan mutánsokat kaptunk, melyekben az egyik allél minden kópiája mutáns volt (5. táblázat), de mindkét allélt egyszerre nem sikerült kiütnünk. Ennek az lehet az egyik oka, hogy 8 allél egyszerre eltalálásának kicsi a valószínűsége, ezért jóval több növényt kellett volna tesztelnünk ahhoz, hogy egy ilyen mutánst találjunk. De az is lehet, hogy a két *GI* elvesztése életképtelen növényeket eredményezne. Az mGI.4/12 esetében 5 olyan mutánst kaptunk, amelyik a *GI.04*-re null mutáns volt és 17 olyan mutáns vonalat azonosítottunk, amelyik a *GI.12*-re null mutáns volt. Ezek között van olyan mutáns vonal is, amelyik az egyik allélra null mutáns, míg a másik allél 1, 2 vagy 3 kópiájában nagy deléció hordoz.

6.5.2. Az mGI.12 mutánsok funkció vizsgálata üvegházi körülmények között

Üvegházi kísérleteket indítottunk az mGI.12 mutánsok fenotípusának és gumóképzésének vizsgálatára. A három kiválasztott mGI.12 mutáns vonalból 8 vegetatívan szaporított 4-hetes egyedeket ültettünk ki steril földdel megtöltött cserepekbe. Kontrollként dupla mennyiségű nem transzformált 'Désirée' növényeket ültettünk.

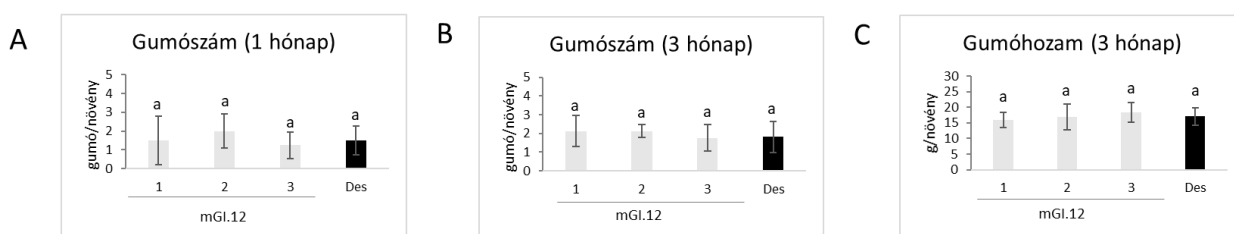
A vegetációs időszak elején, a kiültetés után 23 nappal, majd 10 nappal később is, lemértük az mGI.12 mutáns növények magasságát. Az első mérés során az mGI.12/1 növények átlagosan $24,4 \pm 2$, az mGI.12/2 növények $26,5 \pm 2,1$, az mGI.12/3 növények $30,2 \pm 1,5$ cm-esek voltak. A kontroll növények átlag magassága $22,7 \pm 2,4$ cm volt. Az mGI.12/2 és az mGI.12/3 szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll 'Désirée'. A mutáns vonalak között is szignifikáns eltérést tapasztaltunk. Az mGI.12/1 és az mGI.12/2 szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az mGI.12/3 (45A ábra).



45. ábra: Az mGI.12 növények magassága a 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva. (A) A növények magassága a kiültetés után 23 nappal. (B) A növények magassága a kiültetés után 33 nappal

A második mérés során az átlagos magasságok a következőképpen alakultak: mGI.12/1, $46,1 \pm 3,7$, mGI.12/2 $47,4 \pm 4,4$, mGI.12/3, 48 ± 4 cm, míg a kontroll növények $40,8 \pm 5,3$ cm-esek voltak. Az mGI.12/2 és az mGI.12/3 növények szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontroll növények. Az mGI.12/1 nem különbözött szignifikánsan a többi mutánstól, de magasabb volt, mint a kontroll, bár ez a különbség nem volt szignifikáns (45B ábra).

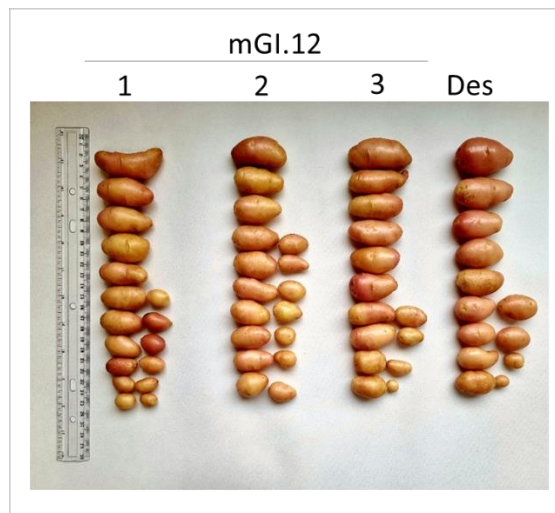
A gumófejlődés koraiságának megbecsüléséhez az egy hónapos növények gumóit most is megszámláltuk. Az mGI.12/1 növényeken átlagosan $1,5 \pm 1,3$, az mGI.12/2 növényeken $2,0 \pm 0,9$, az mGI.12/3 növényeken $1,3 \pm 0,7$ gumó volt. A kontroll növényeken átlagosan $1,5 \pm 0,8$ gumót találtunk. A kezdeti gumószámban tehát szignifikáns eltérést nem kaptunk a kontrollhoz viszonyítva (46A ábra). A növényeket számolás után visszaültettük, majd a vegetációs időszak végéig tovább neveltük üvegházi körülmények között.



46. ábra: Az mGI.12 növények gumószáma és gumóhozama a 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva. (A) Az mGI.12 mutánsok gumószáma a gumófejlődés kezdeti stádiumában. (B) Az mGI.12 mutánsok gumószáma a vegetációs időszak végén. (C) Az mGI.12 mutánsok gumóhozama a vegetációs időszak végén

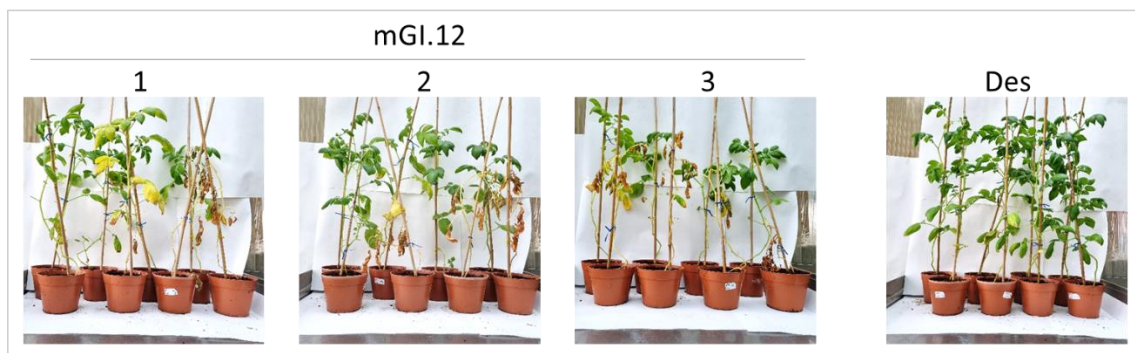
A vegetációs időszak végén újra megszámláltuk a gumókat. Az mGI.12/1 növényeken átlagosan $2,1 \pm 0,8$, az mGI.12/2 növényeken $2,1 \pm 0,4$, az mGI.12/3 növényeken $1,8 \pm 0,7$, a kontroll növényeken $1,8 \pm 0,8$ gumót találtunk. A kezdeti stádiumhoz hasonlóan most sem kaptunk szignifikáns különbséget a gumószámban egyik mutáns vonal esetében sem a kontrollhoz viszonyítva (46B ábra).

A számolást követően megmértük a gumók tömegét. Az mGI.12/1 növényeken átlagosan $15,9 \pm 2,5$, az mGI.12/2 növényeken $16,9 \pm 4,1$, az mGI.12/3 növényeken $18,4 \pm 3,1$, a kontroll növényeken $17,0 \pm 2,9$ g/növény volt a gumóhozam. Szignifikáns különbséget egyik mGI.12 mutáns sem mutatott a kontrollhoz viszonyítva (46C ábra).



47. ábra: Az mGI.12 mutáns vonalak gumói a vegetációs időszak végén

A gumók alakjában, méretében és színében nem volt különbség a mGI.12 mutánsok és kontroll között (47. ábra), így ebben az esetben antocián mérést nem végeztünk.



48. ábra: Az mGI.12 mutánsok morfológiája a vegetációs időszak végén a nem transzformált 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva

A vegetációs időszak végén, mielőtt felszedtük a gumókat, láttuk, hogy az mGI.12 mutáns növények morfológiája eltér a kontrollokétól. Míg a mGI.12 mutánsok a vegetációs időszak végén elkezdtek sárgulni, a levelük megszáradt, addig ez a 'Désirée' növényeken ez még nem volt észlelhető. Az mGI.12 mutáns vonalak tehát előbb mutatták az elhalás/öregedés jeleit, mint a kontroll növények (48. ábra).

6.6. A GI mutáns növényekkel kapott eredmények megvitatása

A GI gének burgonyában betöltött szerepének megismeréséhez több CRISPR/Cas9 konstrukciót hoztunk létre, amelyeket egy kereskedelmi burgonyafajtába, a 'Désirée'-be, juttattunk, majd megvizsgáltuk a mutációk hatását a növény fejlődésére és gumóképzésére.

A CRISPR/Cas9 rendszer eredményesnek bizonyult a *GI* mutánsok előállítására is. Az eGI.04 esetében a látható, nagy deléciók megjelenési gyakorisága 35% volt, míg az eGI.12 mutánsok esetében ilyen mutánsokat 21%-ban kaptunk. Az mGI mutánsok esetében csak null mutánsokat kerestünk. Az mGI.04-ben 2%-os, a mGI.12-ben 63%-os, az mGI.4/12-ben a *GI.04*-re nézve 5%-os, a *GI.12*-re nézve 15%-os gyakorisággal kaptunk olyan mutánsokat, amelyben mindegyik allélban keletkezett mutáció.

Az *in vitro*-ból üvegházba kiültetett eGI.04 és eGI.12 mutáns növények vizsgálatából megállapítottunk, hogy a gumófejlődés megindulására a mutációk nem voltak hatással, szignifikáns eltérést egyik mutáns vonal esetében sem tapasztoltunk a 'Désirée' növényekhez viszonyítva. Ugyanakkor eltérést kaptunk az eGI.04 és a kontroll gumószáma között a vegetációs időszak végén. Bár ez is csak az eGI.04/1 és az eGI.04/2 esetében volt igaz, és csak az első kísérletben találtunk kevesebb gumót rajtuk, mint a kontrollon. A második kísérletben már nem kaptunk a gumószámban szignifikáns különbséget a két eGI.04 mutáns és a 'Désirée' között. Ennek oka lehet az évszaktól függően változó üvegházi környezet, amire talán az eGI.04 mutánsok különösen érzékenyek. Ezt alátámaszthatja az is, hogy bár az eGI.04/3-ban van a legtöbb mutáns variáció, az eGI.04/1 és az eGI.04/2 mutánsokban a GI fehérje C terminális végéből jóval több hiányzik, mint az eGI.04/3-ból. Így tehát korreláció lehet a deléció mérete és a környezeti körülményekre való reagálás mértéke között. De az is lehetséges, hogy az első kísérletben tapasztalt különbségnek csak technikai oka van, mivel a visszaültetésnél gumókat veszthettünk és aránylag kis növény számmal dolgoztunk.

A gumók tömege eltérő módon alakult a *GI* mutánsokban a nem transzformált kontrollhoz viszonyítva. Egyes vonalak esetében (eGI.04/1, eGI.12/2, eGI.12/3) szignifikánsan alacsonyabb gumóhozamot mértünk, míg mások nem mutattak különbséget a kontrollhoz képest. Kiemelendő ezek közül az eGI.12/2, amelyik mindkét kísérletben azonos eredményt adott, míg a többiek esetében az alacsonyabb gumóhozam nem volt ismételhető. Az eGI.12/2 alacsonyabb gumóhozama nem biztos, bár lehet, hogy összefügg a deléció méretével, mivel abban két csonka fehérje és két olyan fehérje szintetizálódik, amiben egy szakasz kiesik, majd visszaáll az eredeti aminosavsorrend. Az eGI.12/1-ben is van legalább egy-egy, az eGI.12/3-hoz hasonló mutáns allél, de a többi fehérjekópia aminosav sorrendje még nem pontosan ismert. Az eGI.12/3-ban pedig van egy olyan fehérjekópia, amiből csak egy aminosav hiányzik. Tehát lehet, hogy az eGI.12/2 és az eGI.12/3 gyengébb mutánsok, mint az eGI.12/3 és ezzel magyarázható, hogy nem, vagy nem minden üvegházi körülmény között mutatnak gumóhozam csökkenést. De az se kizárt, hogy az eGI.12/2-ben van egy „off target” mutáció és ez okozza gumóhozambeli különbséget.

Ahogy már azt többször említettük, a 'Désirée' egy piros héjú burgonyafajta. Az antiszensz aGI vonalak gumóhéjának alacsonyabb az antocián tartalma, mint a kontroll 'Désirée' gumóhéjának. Bár eltérő mértékben és nem mindegyikben, de az eGI mutánsok esetében mi is tapasztaltunk antocián tartalom változást. Az eGI.04/1 és az eGI.12/1 gumóhéjak antocián tartalma szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollé, viszont az eGI.12/2 mutánsé szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollé, amire egyelőre nem tudunk magyarázatot adni.

A fehérje módosulások az eGI mutánsok esetében nem érték el a GI fehérje középső részén elhelyezkedő LOV domént, amihez fotoreceptorok kötődnek és az NLS szekvenciákat sem, ami a GI sejtmagba történő bejutását teszi lehetővé. Ezért újabb konstrukciókat terveztünk, amikkel a *GI* gének középső részét céloztuk meg. Az így létrehozott mutánsokat mGI-nek neveztük. Emellett olyan mutáns vonalakat (mGI4/12) is létrehoznunk, amelyek bár csak az egyik *GI* génre null mutánsok, a másik *GI* génben is deléció(kat) hordoznak. Az első kísérlet alapján megállapítottuk, hogy az mGI.12 mutánsok valamivel magasabbra nőnek, mint a 'Désirée' és életciklusuk rövidebb, hamarabb elsárgulnak, mint a kontroll. Ugyanakkor a gumókötés idejét, a gumóhozamot és a gumók színét és alakját tekintve nem térnek el 'Désirée' kontrolltól. A deléciók térképezése folyamatban van.

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A gumófejlődés megindulásának molekuláris szabályozását a rövid nappalos gumózású *S. tuberosum* Andigena tájfajtával végzett kísérletekből ismerjük. A gumók kialakulását befolyásoló legfontosabb gének: az *SP6A*, a *BEL5* és a *CDF1*. A *CDF1* közvetítő szerepet játszik a cirkadián óra jelei és az *SP6A* mobilizációs jel között a levélben. Közvetett módon a *GI* is szerepet játszik a gumóképzésben, mert az *FKF1*-gyel komplexet alkotva elszállítja a *CDF1*-et a „bontóba”, a proteaszómákhoz (Dutta et al. 2024). Kísérleteink célja az volt, hogy megállapítsuk, milyen szerepe lehet a *CDF1*-nek és *GI*-nek egy naphossztól független gumózású, természetett burgonyafajtában, a 'Désirée'-ben.

A kérdés megválaszolására célzott mutációkat hoztunk létre a *CDF1*-ben és a *GI*-ben, amiből két allélt is találtunk a 'Désirée'-ben, egyiket a 4. (*GI.04*) másikat a 12. (*GI.12*) kromoszómán. A mutánsokat a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével hoztuk létre. A módszer hatékonynak bizonyult, mivel 15%-os gyakorisággal kaptunk 49-117 bp hosszúságú deléciókat hordozó mutáns vonalakat a *CDF1* esetében, a *GI.04* végére tervezett gRNS-ekkel pedig 35%, míg a *GI.12* végére tervezett gRNS-ekkel 21% gyakorisággal kaptunk nagy deléciókat hordozó e*GI.04*, illetve e*GI.12* mutánsokat. Ezek közül három e*GI.04* és két e*GI.12* null mutáns volt. Mivel sikerült a *GI* gének végére tervezett gRNS-ekkel null mutánsokat is izolálni a *GI* gének középső részére tervezett gRNS-ekkel transzformált növények (m*GI.04* és m*GI.12*) között már csak null mutánsokat kerestünk. Az m*GI.04*-ből ilyen mutánsokat csak alacsony gyakorisággal (2%) kaptunk. Ezzel szemben az m*GI.12* null mutánsok gyakorisága 64% volt. A nagy különbséget magyarázhatja a gRNS-ek hatékonysága, de lehet, hogy a *GI.04* fontosabb szerepet játszik a 'Désirée'-ben, mint a *GI.12*, így, ha a deléció egy bizonyos pontot elér a *GI.04*-ben, a növény életképtelen. A mutációk térképezése, ami folyamatban van, talán közelebb vihet ennek a gyakoriságbeli különbségnek a megértéséhez.

A *CDF1* mutánsainkban a deléciók a 3' nem transzlált régióra korlátozódtak. Ez, bár a gumófejlődés megindulási idejét, a gumószámot és hozamot lényegesen nem befolyásolta, de a mutánsok szárvastagságában különbségeket fedeztünk fel, melyek a kontrollokhöz képest vékonyabbak lettek, ezen felül az összetett levelek kialakulása is késett. Ebből arra következtetünk, hogy a *CDF1* a 'Désirée'-ben szerepet játszik a hajtásfejlődésben. A három vizsgált mutáns közül kettőben hosszabb volt a gumók nyugalmi időszaka, kisebb csírák voltak a gumókon, mint a kontrollon, mikor elültettük őket. Így, ezzel összhangban, késett a gumókból a hajtások fejlődése. A keményítő lebontása, a szacharóz elérhetősége a csírázás egyik előfeltétele. A másik fontos tényező a merisztéma aktivitás változása, ami kulcsszerepet játszik a csírázásban. A merisztéma funkció újraaktiválása egybeesik a nyugalmi állapot végével (Ferreira et al. 2017).

Ezért érdemes lenne a CDF1 mutáns gumókat metabolit szinten elemezni és a merisztéma aktivitással összefüggésbe hozható gének transzkripciós szintjét megvizsgálni.

A két *GI* gén, a *GI.04* és *GI.12*, eltérést mutatott mind a promóter-, mind pedig a kódoló régióban, de sok hasonlóság is volt köztük. Például mindkét *GI* gén promóterében megtaláltuk a cirkadián szabályozáshoz kapcsolható REV1/8 kötőhelyet. Ez alapján feltételezzük, hogy a 'Désirée' két *GI* génjének expressziója is napi ciklushoz köthető, akárcsak a *S. tuberosum* Andigena és a Neo-Tuberosum *GI* génjének átírása (Morris et al. 2014). Ezt érdemes lenne kísérletesen is bizonyítani.

Egy *GI.04* expresszióban 50%-ban gátolt vonal, az aGI52 levelének transzkriptom elemzése kimutatta, hogy a *GI.04* gátlása a *REVI* expressziójának növekedését idézi elő. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy más növényfajokhoz hasonlóan (Liu et al. 2024), a *GI* a burgonyában is részt vesz a cirkadián óra szabályozásában és negatív hatással van a *REVI* expressziójára, ami viszont visszahat mindkét *GI* transzkripciójára. A REV1 kötődését a *GI* promóterekhez élesztő 1-hibrid rendszerben lehetne vizsgálni, illetve *REVI* gátolt antiszensz vonalak előállításával, és ezekben a *GI* gének expressziós mintázatának vizsgálatával bizonyítani a feltételezett kölcsönhatást.

A PlantRegMap mindkét *GI* promóterében talált virágzással kapcsolatos TF kötőhelyeket (pl. SOC1, ABI5) és a *GI.04* expressziójának gátlása 7 virágzással kapcsolatba hozható TF mRNS-ének szintjét is megváltoztatta a levélben. Ez arra utal, hogy más növényfajokhoz hasonlóan (Liu et al. 2024), a *GI* a burgonyában is részt vesz a virágfejlődés szabályozásában. A jövőben érdemes lenne virágzáshoz kapcsolódó kísérleteket végezni, amelyek bizonyítani vagy cáfolni tudnák ezt a feltételezést.

Odgerel (2022) megállapította, hogy a két *GI* gén különböző módon reagál a stresszre. Míg a *GI.04* expressziót a hő, hideg és az ozmotikus stressz aktiválja, addig a *GI.12* expressziót csak az ABA emeli meg, az abiotikus stresszek gátló hatással vannak rá. Ennek egyik magyarázata lehet az, hogy a *GI.04* promóterében vannak MYB TF kötőhelyek, míg a *GI.12*-ben nincsenek. Annak ellenére, hogy ABA-ra reagáló TF-ok kötőhelyét mindkét promóterben megtaláltuk a *GI.04* nem reagál az ABA-ra. A *GI* mutánsokkal tervezett stresszhez kapcsolódó kísérletek segíthetnek a két *GI* gén stresszválaszainak megismerésében.

A *GI* gének promóterében POTH20 TF kötőhelyeket is azonosítottunk. A POTH20 a POTH1-gyel 73%-ban azonos (Rosin et al. 2013). A POTH1 a BEL5-tel heterodimert alkotva magának a *BEL5*-nek és a *GA2-OXIDASE 1*-nek a transzkripcióját is szabályozza, és ezáltal a gumóképzést befolyásolja (Lin et al. 2013). Kérdés, hogy a POTH20 helyettesíteni tudná-e a

POTH1-et és valóban kapcsolódik-e a *GI* gének promóteréhez. Ennek megválaszolására élesztő hibrid rendszereket lehetne használni.

Eddig sem a *CDF1*, sem az eddig vizsgált *GI* mutánsok nem mutattak semmilyen változást a gumófejlődés megindulásának időpontját illetően. Ez azonban még nem zárja ki annak lehetőségét, hogy szerepük lehet a gumófejlődés megindításában, mert a *CDF1* deléciók a kódoló régió kívül vannak, az eGI mutánsokban pedig lehet, hogy nem érik el a fehérje működése szempontjából fontos régiót. Figyelembe véve azonban, hogy az mGI.12 mutánsok sem változtak meg a gumófejlődés megindulásának időpontját illetően, feltételezzük, hogy a *CDF1*-nek, és vele kapcsolatban a *GI*-nek, nincs akkora jelentősége a gumóképzés szempontjából a naphossztól független gumózású 'Désirée'-ben, mint a csak rövid nappalos körülmények között gumót fejlesztő *S. tuberosum* Andigena tájfajtában. Ennek alátámasztására azonban folytatnunk kell az mGI mutánsokban a deléciók térképezését és tesztelni kell üvegházi körülmények között a mGI.04 mutánsokat.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- A természetett 'Désirée' burgonyafajtában sikeresen alkalmaztuk a CRISPR/Cas9 genomszerkesztési rendszert a *CDF1*, a *GI.04* és a *GI.12* gének célzott mutagenezisére.
- A g*CDF1* mutánsokban a deléciók jelentős változást okoztak a *CDF1* mRNS 3' végének szerkezetében és megállapítottuk, hogy a 'Désirée'-ben a *CDF1* szerepet játszik a hajtásfejlődésben.
- A 'Désirée'-ben két *GI* gént (*GI.04*, *GI.12*) találtunk, melyek sok azonosságot, de eltérést is mutatnak mind a promóter-, mind a kódoló régióban.
- Mindkét *GI* gén promoterében jelenlévő elemekből arra következtettünk, hogy a 'Désirée' két *GI* génjének expressziója a napi ciklushoz köthető és a *GI* géneknek szerepe van a virágzás megindításában és a stresszválaszokban, amit megerősített egy *GI.04* expresszióban gátolt vonalban a virágzással és stresszel kapcsolatos TF-ok 'Désirée'-től eltérő mRNS szintje is.
- Létrehoztunk olyan null mutáns vonalakat, amelyek a *GI.04* és a *GI.12* 3' végéhez közeli deléciókat hordoztak. A deléciókat DNS szekvencia szinten behatároltuk és megállapítottuk, hogy a *GI* gének 3' végén található deléciók nincsenek hatással a gumófejlődés megindulására.
- Létrehoztunk olyan null mutánsokat, amelyek a *GI.04* és a *GI.12* középső részén deléciót hordoznak, és olyanokat is, melyek az egyik génre nézve null mutánsok, a másik génben pedig nagy deléció(kat) hordoznak.
- Kimutattuk, hogy a *GI.12* középső részén deléciót hordozó mutánsok magasabbak, mint a 'Désirée', életciklusok rövidebb, de a gumófejlődés megindulásának időpontját tekintve nem térnek el tőle.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A világon az egyik legfontosabb élelmiszer növényünk a burgonya (*Solanum tuberosum* L.). Kedvező táplálkozás-élettani tulajdonságai és sokrétű felhasználhatósága miatt fontos szerepet tölt be mindennapjainkban, ezért a gumó fejlődésének kutatása fontos feladat. A nemesítők egyik célja a koraiság növelése. A burgonya szaporodási ciklusának meghatározásában, a környezeti tényezők mellett, a genetikai tényezők is fontos szerepet játszanak. A gumófejlődés megindítóit a levélből származó floém-mobil jelek, melyek eljutnak a földalatti módosult szárhoz, a sztólóhoz. A gumófejlődés megindításának három fő szabályozó eleme az SP6A, a BEL5 és a CDF1. A CDF1 az obligát rövid nappalos *S. tuberosum* Andigena-ban a gumófejlődés megindulásának időpontját határozza meg. Kísérleteink egyik célja az volt, hogy megismerjük a CDF1 szerepét egy naphossztól független gumózású kereskedelmi fajtában, a 'Désirée'-ben. A GI közvetett formában, de részt vesz a gumókötés idejének meghatározásában, az FKF1-gyel komplexet alkotva eljuttatja a CDF1-et a proteaszómákhoz, ahol a CDF1 lebomlik. Ezért kísérleteink másik célja az volt, hogy megismerjük a GI gumókötésben betöltött szerepét a 'Désirée'-ben.

A kérdések megválaszolásához CRISPR/Cas9 rendszerrel mutációkat hoztunk létre két génben, a *CDF1*-ben és a *GI*-ben. A módszer 'Désirée'-ben hatékonyan bizonyult, mivel több deléció hordozó- és null mutánst is kaptunk. A *CDF1* mutánsokban a deléciók a gén 3' nem transzlálódó régióját érintették. A fenológiai eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a *CDF1* szerepet játszik a hajtásfejlődésben, viszont a gumófejlődésben betöltött szerepére bizonyítékot nem kaptunk.

Az *Arabidopsis* génjével hasonlóságot keresve két *GI* gént (*GI.04*, *GI.12*) találtunk a 'Désirée'-ben, melyeknek a promóter- és a kódoló régiója is eltérő. Mindkét promóterben találtunk EE motívumot és ABREL elemeket, ezért úgy gondoljuk, hogy a két *GI* gén expressziója, akárcsak más burgonya fajtákban, a 'Désirée'-ben is a napi ciklushoz köthető. A *GI* promóterekben találtunk virágfejlődéshez, stresszhez kapcsolódó TF kötőhelyeket, így feltételezzük, hogy a virágfejlődésben és az stresszre adott válaszokban is részt vesznek a *GI* gének. Ennek bizonyításához azonban további kísérletek szükségesek.

A promóter elemzéssel összhangban, egy *GI.04* expresszióban gátolt vonal transzkriptom elemzésével kimutattuk, hogy a *GI.04* befolyásolja egy virágzásban résztvevő TF, a REV1, és több cirkadián óra szabályozásában résztvevő TF génjének kifejeződését is. Emellett valószínű, hogy a *GI* a növények környezeti stresszre adott válaszaiban is részt vesz, mivel a *GI.04* expresszióban gátolt növények levelében védekezési mechanizmusban résztvevő, aktiválódott TF-okat is azonosítottunk. A keményítőszintézis génjei gátlódtak, míg a cukorhírvivő aktiválódott, ami a *GI* szénhidrát anyagcserében betöltött szerepére utal.

Az eddig megvizsgált *GI* 3' végén delécióát hordozó mutánsok (eGI) nem mutattak semmilyen változást a gumófejlődés megindulásának időpontjában. Mivel az eGI mutánsokban a fehérje módosulások nem érték el a GI fehérje középső részén található LOV domént, amihez a fotoreceptorok kötődnek, és az NLS szekvenciákat sem, amelyek a GI sejtmagba juttatásához szükségesek, újabb konstrukciókat hoztunk létre, amikkel a *GI* gének középső részét céloztuk meg, bízva abban, hogy a fent említett szakaszokat eléri a mutációk és hatással lesznek a gumófejlődésre (mGI mutánsok). Ezen kívül létrehoztunk olyan mutáns vonalakat is, amelyek az egyik *GI* génre null mutánsok, a másokra delécióát vagy deléciókat hordoznak (mGI.4/12). Az mGI mutánsok delécióinak térképezése folyamatban van. Az első üvegházi kísérlet alapján az mGI.12 mutánsok magasabbak és rövidebb életciklussal rendelkeznek, mint a kontroll növények, de nem mutatnak a 'Désirée'-től eltérő gumófejlődési jellemzőket. Lehetséges, hogy a *GI* géneknek nincs akkora jelentősége a gumóképzés szempontjából a naphossztól független gumózású 'Désirée'-ben, mint a rövid nappalos gumózású *S. tuberosum* Andigena-ban. De nem zárható ki az sem, hogy a két *GI* gén helyettesíteni tudja egymást a gumófejlődés megindításában. Ennek eldöntésére és a két *GI* gén szerepének jobb megismerésére további kísérletekre van szükség.

10. SUMMARY

One of the most important food crops in the world is potato (*Solanum tuberosum* L.). Due to its beneficial nutritional-physiological properties and its manifold uses, it plays an important role in our everyday life. Thus, the research on tuber development is an important task. One of the goals of the breeders is to increase the earliness of tuberisation. In addition to environmental factors, genetic factors also play an important role in determining the reproductive cycle of potatoes. Induction of tuber development is based on phloem-mobile signals originating from the leaf and reaching the underground modified stem, the stolon. The three main regulatory elements for induction of tuber development are SP6A, BEL5 and CDF1. CDF1 determines the time of onset of tuber development in the obligate short-day tuberising *S. tuberosum* Andigena. One of the goals of our experiments was to understand the role of CDF1 in a commercial variety 'Désirée' with tuberisation independent of day length. GI is indirectly involved in determining the time of tuberisation as it forms a complex with FKF1 to deliver CDF1 to the proteasomes, where CDF1 is degraded. Therefore, the other goal of our experiments was to get information on the role of GI in tuberisation of 'Désirée'.

To achieve these goals, we used the CRISPR/Cas9 system to generate mutations in two genes, *CDF1* and *GI*. The method proved effective in 'Désirée', as several deletion-bearing and null mutants were obtained. In *CDF1* mutants, deletions affected the 3' non-translated region of the gene. Based on phenological results, we concluded that CDF1 plays a role in shoot development, but no evidence of its role in tuber development was obtained.

Looking for similarities with the *Arabidopsis* gene, we found two *GI* genes (*GI.04* and *GI.12*) in 'Désirée', which were different in their promoter and coding regions. We found EE motifs and ABREL elements in both promoters suggesting that the expression of the two *GI* genes, as in other potato varieties, is related to the diurnal cycle also in 'Désirée'. We found TF binding sites related to flower development and stress in *GI* promoters. Thus, we hypothesize that *GI* genes are involved in flower development and stress responses. However, further experiments are needed to prove this hypothesis.

In line with the result of promoter analysis, transcriptome analysis of a line silenced in *GI.04* expression showed that *GI.04* influences the expression of the TF gene *REVI* involved in flowering, and several TFs related to circadian clock regulation. In addition, it is likely that *GI* is also involved in plant responses to environmental stresses, as activated TFs involved in defense mechanisms have been identified in the leaves of *GI.04* silenced plants. Expression of genes for starch synthesis were inhibited, while a sugar messenger was activated, suggesting the role of *GI* in carbohydrate metabolism.

The mutants with deletions at the 3' end of *GI* (eGI) were not changed in the time of tuber development. Since the protein modifications in the eGI mutants did not reach the LOV domain in the middle part of the GI protein, to which photoreceptors bind, nor the NLS sequences needed to deliver GI to the nucleus, we created new constructs targeting the middle part of the *GI* genes, expecting that the mutations would reach the regions specified above and affect tuber development (mGI mutants). In addition, mutant lines have been generated which are null mutants for one *GI* gene and have a deletion or deletions for the other *GI* gene (mGI.4/12). Mapping of the deletions in mGI mutants is ongoing. Based on the first greenhouse experiment, mGI.12 mutants are taller and have a shorter life cycle than control plants, but do not differ in tuber development characteristics from 'Désirée'. Thus, we concluded that *GI* genes may not be as important for tuber formation in the light-independent tuberising 'Désirée' as in the short-day tuberising *S. tuberosum* Andigena. However, it is also possible that the two *GI* genes can replace each other in initiating tuber development. Further experiments are needed to get evidence on it and better understand the role of the two *GI* genes in the commercial potato cultivar 'Désirée'.

11. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

- ASMAMAW, M., ZAWDIE, B. (2021): Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9 mediated genome editing. In: *Biologics*, 2021 (15) 353-361. p. <https://doi.org/10.2147/BTT.S326422>
- AUKERMAN, M.J., SAKAI, H. (2003): Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. In: *The Plant Cell*, 15 (11): 2730-2741.p. <https://doi.org/10.1105/tpc.016238>
- BALÁZS, S. (1994) Korai burgonya. Zöldségtermesztők kézikönyve. Budapest: Mezőgazda Kiadó. 283- 287. p.
- BANERJEE, A. K., CHATTERJEE, M., YU, Y., SUH, S. G., MILLER, W. A., HANNAPEL, D. J. (2006): Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. In: *Plant Cell*, 18 (12) 3443–3457 p. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042473>
- BÁNFALVI, Z., CSÁKVÁRI, E., VILLÁNYI, V., KONDRÁK, M. (2020): Generation of transgene-free *PDS* mutants in potato by *Agrobacterium*-mediated transformation. In: *BMC Biotechnology*, 20 (25) <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00621-2>
- BERNS, M. C., NORDSTRÖM, K., CREMER, F., TÓTH, R., HARTKE, M., SIMON, S., KLASSEN, J. R., BÜRSTEL, I., COUPLAND, G. (2014): Evening expression of *Arabidopsis GIGANTEA* is controlled by combinatorial interactions among evolutionarily conserved regulatory motifs. In: *Plant Cell*, 26 (10) 3999–4018. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.129437>
- BRANDOLI, C., PETRI, C., EGEA-CORTINES, M., WEISS, J. (2020a): Gigantea: Uncovering new functions in flower development. In: *Genes*, 11 (10) 1142. p. <https://doi.org/10.3390/genes11101142> (a)
- BRANDOLI, C., PETRI, C., EGEA-CORTINES, M., WEISS, J. (2020b): The clock gene *Gigantea 1* from *Petunia hybrida* coordinates vegetative growth and inflorescence architecture. In: *Scientific Report*, 10 (1) 275. p. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57145-9> (b)
- CAO, S., JIANG, S., ZHANG, R. (2006): The role of *GIGANTEA* gene in mediating the oxidative stress response and in *Arabidopsis*. In: *Plant Growth Regulation*, 48 261-270. p. <https://doi.org/10.1007/s10725-006-0012-8>
- CEASAR, S. A., RAJAN, V., PRYKHOZHII, SZ. V., BERMAN, J. N., IGNACIMUTHU, S. (2016): Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. In: *BBA-Molecular Cell Research*, 1863 (9) 2333-2344. p. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.009>
- CHA, J-Y., LEE, D-Y., ALI, I., JEONG, S.Y., SHIN, B., JI, H., KIM, J.S., KIM, M-G., KIM, W-Y. (2019): *Arabidopsis GIGANTEA* negatively regulates chloroplast biogenesis and resistance to herbicide butafenacil. In: *Plant Cell Reports*, 38 793-801. p. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02409-x>
- CHOI, H.-Y., HONG, J.-H., KANG, J.-Y., KIM, S. Y. (2000): ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. In: *Journal of Biological Chemistry*, 275 (3) 1723–1730. p. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1723>
- DALCHAU, N., BAEK, S.J., BRIGGS, H.M., ROBERTSON, F.C., DODD, A.N., GARDNER, M.J., STANCOMBE, M.A., HAYDON, M.J., STAN, G-B., GONCALVES, J.M., WEBB, A.A.R. (2011): The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose. In: *PNAS*, 108 (12) 5104-5109. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015452108>

- DIETZE, J., BLAU, A., WILLMITZER, L. (1995): *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In: *GENE TRANSFER TO PLANTS*. Berlin, Germany, 24-29. p.
- DITTA, G., STANFIELD, S., CORBIN, D., HELINSKI, D. R. (1980): Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (12) 7347–7351. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7347>
- DUTTA, M., MALI, S., RATURI, V., ZINTA, G. (2024): Transcriptional and Post-transcriptional regulation of tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Journal of Plant Growth Regulation*, 43 1-24. p. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11053-5>
- ECK, J.V. (2018): Genome editing and plant transformation of solanaceous food crops. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 49 35-41. p. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.012>
- EIMERT, K., WANG, S.M., LUE, W.I., CHEN, J. (1995): Monogenic Recessive Mutations Causing Both Late Floral Initiation and Excess Starch Accumulation in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell*, 7 (10) 1703-1712. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.10.1703>
- FERREIRA, S.J., SENNING, M., FISCHER-STETTLER, M., STREB, S., AST, M., NEUHAUS, H.E., ZEEMAN, S.C., SONNEWALD, S. (2017): Simultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype. In: *Plos One*, 12 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181444>
- FIGURSKI DH, HELINSKI DR. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (4) 1648-1652. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- FITZGERALD, H.A., CANLAS, P.E., CHERN, M-S., RONALD, P.C. (2005): Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. In: *The Plant Journal*, 43 (3) 335-347. p. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02457.x>
- FOWLER, S., LEE, K., ONOUCHI, H., SAMACH, A., RICHARDSON, K., MORRIS, B., COUPLAND, G., PUTTERILL, J. (1999): *GIGANTEA*: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. In: *EMBO J* 18 4679– 4688. p. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4679>
- GONZALES, L.R., SHI, L., BERGONZI, S.B., OORTWIJN, M., FRANCO-ZORRILLA, J.M., SOLANO-TAVIRA, R., VISSER, R.G.F., ABELENDA, J.A. AND BACHEM, C.W.B. (2021): Potato CYCLING DOF FACTOR 1 and its lncRNA counterpart *StFLORE* link tuber development and drought response. In: *The Plant Journal*, 105 (4) 855- 869. p. <https://doi.org/10.1111/tpj.15093>
- GRAY, J. A., SHALIT-KANEH, A., CHU, D. N., HSU, P. Y., HARMER, S. L. (2017): The REVEILLE clock genes inhibit growth of juvenile and adult plants by control of cell size. In: *Plant Physiol*, 173 (4) 2308–2322. p. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00109>
- HALL, A., BASTOW, R. M., DAVIS, S. J., HANANO, S., MCWATTERS, H. G., HIBBERD, V., ET AL (2003): *The TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clocks. In: *Plant Cell* 15 (11) 2719– 2729. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.013730>
- HANAHAN, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology*, 166 (4) 557–580. p. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- HANNAPPEL, D. J. (2007): Signaling the induction of tuber formation. In: *Potato Biology and Biotechnology*. Elsevier, 237-256.p. <https://doi.org/10.1016/B978-044451018-1/50054-3>

- HANNAPEL, D.J., SHARMA, P., LIN, T., BANERJEE, A.K. (2017): The multiple signals that control tuber formation. In: *Plant Physiol*, 174 (2) 845-856. p. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00272>
- HARMER, S. L., HOGENESCH, J. B., STRAUME, M., CHANG, H. S., HAN, B., ZHU, T., WANG, X., KREPS, J. A., KAY, S. A. (2000): Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. In: *Science*, 290 (5499) 2110–2113. p. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2110>
- HAYDON, M.J., MIELCZAREK, O., FRANK, A., ROMÁN, A., WEBB, A.A.R. (2017): Sucrose and Ethylene Signaling Interact to Modulate the Circadian Clock. In: *Plant Physiology*, 175 (2) 947-958. p. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00592>
- HELPER, A., NUSINOW, D. A., CHOW, B. Y., GEHRKE, A. R., BULYK, M. L., KAY, S. A. (2011): *LUX ARRHYTHMO* encodes a night time repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. In: *Current Biology* 21 (2) 126–133. p. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.021>
- HERNANDEZ-GARCIA, C. M., FINER, J. J. (2014): Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. In: *Plant Science*, 217–218 109–119. p. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>
- HÍDVÉGI SZ. (2007): Növénytermesztés. DE AMTC AVK, Debrecen, 73-78. p.
- HOEKEMA, A., HIRSCH, P. R., HOOYKAAS, P. J. J., SSCHILPEROORT, R. A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. In: *Nature*, 303 179–180. p. <https://doi.org/10.1038/303179a0>
- HOFFMANN, S. (2011): A burgonya integrált termesztése. In: *Ipari-és takarmánynövények termesztése*. Debreceni Egyetem, Debrecen, 40-53. p.
- HOFVANDER, P., ANDREASSON, E. ANDERSSON, M. (2022): Potato trait development going fast-forward with genome editing. In: *Trends in Genetics*, 38 (3) 218-221. p. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.10.004>
- HÖFGEN, R., WILLMITZER, L. (1988): Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. In: *Nucleic Acid Research*, 16 (20) 9877 p. <https://doi.org/10.1093/nar/16.20.9877>
- HSU, P. D., LANDER, E. S., ZHANG, F. (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. In: *Cell*, 157 (6) 1262-1278. p. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- HUDACSEK, V., GYÖRFFY, B. (2018): A CRISPR-Cas9 rendszerrel végzett genomszerkesztés módszere és onkológiai alkalmazásai. In: *Magyar Onkológia*, 62 119-127. p.
- HUQ, E., TEPPERMAN, J.M., QUAIL, P.H. (2000): GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. In: *PNAS* 97 (17) 9789-9794. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.170283997>
- INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene*, 96 (1) 23-28 p. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)
- ISHINO, Y., KRUPOVIC, M., FORTERRE, P. (2018): History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. In: *Journal of Bacteriology*, 200 (7) e00580-17 p. <https://doi.org/10.1128/jb.00580-17>
- IZAWA, T., MIHARA, M., SUZUKI, Y., GUPTA, M., ITOH, H., NAGANO, A.J., MOTOYAMA, R., SAWADA, Y., YANO, M., HIRAI, M.Y., MAKINO, A., NAGAMURA, Y.

- (2011): Os-*GIGANTEA* Confers Robust Diurnal Rhythms on the Global Transcriptome of Rice in the Field. In: *The Plant Cell*, 23 (5) 1741-1755. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083238>
- JANG, G., JOUNG, Y. H. (2019): CRISPR/Cas-mediated genome editing for crop improvement: current applications and future prospects. In: *Plant Biotechnol Reports*. 13 1–10. p. <https://doi.org/10.1007/s11816-018-0509-4>
- JIANG, C-H., HUANG, Z-Y., XIE P., GU, C., LI, K., WANG, D-C., YU, Y-Y., FAN, Z-H., WANG, C-J., WANG, Y-P., GUO, Y-H., GUO, J-H. (2016): Transcription factors WRKY70 and WRKY11 served as regulators in rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in *Arabidopsis*. In: *Journal of Experimental Botany*, 67 (1) 157-174. p. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv445>
- JOSE, J. (2019): Moleculaar genetic studies on GIGANTEA gene in potato (*Solanum tuberosum* L.). Doktori értekezés, MATE, Gödöllő.
- JOSE, J., BÁNFALVI, Z. (2019): The role of GIGANTEA in flowering and abiotic stress adaptation in plants. In: *Columella*, 6 7–18 p.
- KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, ZS. (2023): A *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* gén szerepe a ‘Désirée’ burgonyafajtában. In: *Kertgazdaság*, 55(2023)2.
- KAWAMURA, H., ITO S., YAMASHINO, T., NIWA, Y., NAKAMICHI, N., MIZUNO, T. (2008): Characterisation of genetic links between two clock-associated genes, *GI* and *PRR5* in the current clock model of *Arabidopsis thaliana*. In: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72 (10) 2770–2774. p. <https://doi.org/10.1271/bbb.80321>
- KIM, J., GENG, R., GALLENSTEIN, R.A., SOMERS, D.E. (2013): The F-box protein ZEITLUPE controls stability and nucleocytoplasmic partitioning of GIGANTEA. In: *Development* 104 (19) 4060-4069.p. <https://doi.org/10.1242/dev.096651>
- KLOOSTERMAN, B., ABELENDA, J. A., CARRETERO-GOMEZ, M., OORTWIJN, M., DE BOER, J. M., KOWITWANICH, K., HORVATH, B. M., VAN ECK, H. J., SMACZINIÁK, C., PRAT, S., VISSER, R.G.F., BACHEM, C.W.B. (2013): Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. In: *Nature*, 495 246–250. p. <https://doi.org/10.1038/nature11912>
- KNOCHE, K., KEPHART, D. (1999): Cloning blunt-end Pfu DNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T Vector Systems. In: *Promega Notes*, 71 10–13 p.
- KONDHARE, K.R., VETAL, P.V., KALSI, H.S., BANERJEE, A.K. (2019): BEL1-like protein (StBEL5) regulates *CYCLING DOF FACTOR1 (StCDF1)* through tandem TGAC core motifs in potato. In: *Journal of Plant Physiology*, 241 153014. p. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153014>
- KONDRÁK, M., KOPP, A., URI, Cs., SÓS-HEGEDŰS, A., CSÁKVÁRI, E., SCHILLER, M., BARTA, E., CERNÁK, I., POLGÁR, Zs., TALLER, J., BÁNFALVI, Zs. (2020): Mapping and DNA sequence characterisation of the *Ry_{sto}* locus conferring extreme virus resistance to potato cultivar ‘White Lady’. In: *Plos ONE*, 15 (3) e0224534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224534>
- KRAHMER, J., GORALOGIA, G.S., KUBOTA, A., ZARDILIS, A., JOHNSON, R.S., SONG, Y.H., MACCOSS, M.J., BIHAN, T.L., HALLIDAY, K.J., IMAIZUMI, T., MILLAR, A.J. (2018): Time-resolved interaction proteomics of the GIGANTEA protein under diurnal cycles in *Arabidopsis*. In: *FEBS Letters*, 593 (3) 319-338. p. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13311>
- KWON, E., PATHAK, D., DAHAL, P., TANDUKAR, S., JUNG, H. S., KIM, W-Y., KIM, D. Y. (2022): Structural analysis of the regulation of blue-light receptors by GIGANTEA. In: *Cell Preprints*, 39 (3) 110700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110700>

- LEE, H., SUNG-SUK, S., PARK, E., CHO, E., AHN, J.H., KIM, S-G., LEE, J. S., KWON, Y. M., LEE, I. (2000): The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. In: *Genes and Development*, 14 2366–2376. p. <https://doi.org/10.1101/gad.813600>
- LEHRETZ, G. G., SONNEWALD, S., HORNYIK, CS., CORRAL J.M. AND SONNEWALD, U. (2019): Post-transcriptional Regulation of *FLOWERING LOCUS T* Modulates Heat-Dependent Source-Sink Development in Potato. In: *Current Biology*, 29 (10), 1614-1624. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.027>
- LEHRETZ, G. G., SONNEWALD, S., SONNEWALD, U. (2021): Assimilate highway to sink organs-Physiological consequences of SP6A overexpression in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Journal of Plant Physiology*, 266. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153530>
- LI, B., JIANG, S., YU, X., CHENG, C., CHEN, S., CHENG, Y., YUAN, J.S., JIANG, D., HE, P., SHAN L. (2015): Phosphorylation on Trihelix Transcriptional Repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates Arabidopsis Immunity. In: *The Plant Cell*, 27 (3) 839-856. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134809>
- LIN, T., SHARMA, P., GONZALEZ, D.H., VIOLA, I.L, HANNAPPEL, D.J. (2013): The impact of the long-distance transport of a *BEL1*-like messenger RNA on development. In: *Plant Physiology*, 161 (2) 760-772. p. <https://doi.org/10.1104/pp.112.209429>
- LIU, H., YU, X., LI, K., KLEJNOT, J., YANG, H., LISIERO, D., LIN, C. (2008): Photoexcites CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. In: *Science*, 322 (597) 1535-1539. p. <https://doi.org/10.1126/science.1163927>
- LIU, L., XIE, Y., YAHAYA, B.S., WU, F. (2024): *GIGANTEA* unveiled: exploring its diverse roles and mechanisms. In: *Genes*, 15 (1) 94. p. <https://doi.org/10.3390/genes15010094>
- LOPEZ-MOLINA, L., MONGRAND, S., CHUA, N-H. (2001): A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. In: *PNAS*, 98 (8) 4782-4787. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.081594298>
- LORENZO, O., PIQUERAS, R., SÁNCHEZ-SERRANO, J.J., SOLANO, R. (2003): ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. In: *The Plant Cell*, 15 (1) 165-178. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.007468>
- LU, S. X., WEBB, C. J., KNOWLES, S. M., KIM, S. H. J., WANG, Z., TOBIN, E. M. (2012): CCA1 and ELF3 interact in the control of hypocotyl length and flowering time in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiol* 158 (2) 1079–1088. p. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189670>
- MÁTÉ, A. (2010): A burgonya termesztése (*Solanum tuberosum* L.). In: *Szántóföldi növénytermesztés*. SZIE, Gödöllő, 46-54. p.
- MISHRA, P., PANIGRAHI, K. C. (2015): *GIGANTEA*-an emerging story. In: *Front Plant Sci*, 26 (6) 6–8. p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
- MORRIS, W. L., HANCOCK, R. D., DUCREUX, L. J., MORRIS, J. A., USMAN, M., VERRALL, S. R., SHARMA, S. K., BRYAN, G., MCNICOL, J. W., HEDLEY, P. E., TAYLOR, M. A. (2014): Day length dependent restructuring of the leaf transcriptome and metabolome in potato genotypes with contrasting tuberization phenotypes. In: *Plant Cell and Environment*, 37 (6) 1351–1356. p. <https://doi.org/10.1111/pce.12238>
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum*, 15 (3) 473–497. p. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- NAKAMICHI, N., KITA, M., NIINUMA, K., ITO, S., YAMASHINO, T., MIZOGUCHI, T., MIZUNO, T. (2007): Arabidopsis clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. In: *Plant and Cell Physiology*, 48 (6) 822–832. p. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm056>
- NATARAJAN, B., KONDHARE, K.R., HANNAPEL, D.J., BANERJEE, A.K. (2019): Mobile RNAs and proteins: Prospects in storage organ development of tuber and root crops. In: *Plant Science*, 284 73-81.p. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.019>
- NAVARRO, C., ABELENDA, J. A., CRUZ-ORÓ, E., CUÉLLAR, C. A., TAMAKI, S., SILVA, J., SHIMAMOTO, K., PRAT, S. (2011): Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. In: *Nature*, 478 119-122. p. <https://doi.org/10.1038/nature10431>
- NUSINOW, D. A., HELFER, A., HAMILTON, E. E., KING, J. J., IMAIZUMI, T., SCHULTZ, T. F. ET AL (2011): The ELF4-ELF3- LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. In: *Nature*, 475 398– 402. p. <https://doi.org/10.1038/nature10182>
- NYITRAY, L., PÁL, G. (2013): A biokémia és molekuláris biológia alapjai. Elméleti e-könyv. ELTE, TTK, Budapest. <https://ttk.elte.hu/dstore/document/836/A%20biok%C3%A9mia%20%C3%A9s%20molekul%C3%A1ris%20biol%C3%B3gia%20alapjai.jav.pdf>
- ODGEREL, K. (2022):_Molecular genetics and metabolomic studies related to tuberization and metabolite composition of cultivated potatoes. Doktori értekezés, MATE, Növénytudományi Doktori Iskola, Gödöllő.
- ODGEREL, K., JOSE, J., KARSAI-REKTENWALD, F., FICZEK, G., SIMON, G., et al. (2022): Effects of the repression of *GIGANTEA* gene *StGI.04* on the potato leaf transcriptome and the anthocyanin content of the tuber skin. In: *BMC Plant Biology*, 22, 249. p. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03636-3>
- PALTIEL, J., AMIN, R., GOVER, A., ORI, N., SAMACH, A. (2006): Novel roles for *GIGANTEA* revealed under environmental conditions that modify its expression in *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. In: *Planta* 224 1255–1268. p. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0305-1>
- PARK, D. H., SOMERS, D. E., KIM, Y. S., CHOY, Y. H., LIM, H. K., SOH, M. S., KIM, H. J., KAY, S. A., NAM, H. G. (1999): Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. In: *Science* 285 (5433) 1579–1582. p. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1579>
- POTATO GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2011): Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. In: *Nature* 475 189–195. p. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
- RADICS, L. (1994): Gyökér és gumós növények. In: *Szántóföldi növénytermesztés tan. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Kertészeti Kar, Budapest*, 106-126. p.
- RAWAT R., SCHWARTZ, J., JONES, M.A, SAIRANEN, I., CHENG, Y., ANDERSSON, C.R., ZHAO, Y., LJUNG, K., HARMER, S.L. (2009): REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. In: *PNAS*, 106 (39) 16883-16888. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813035106>
- RÉDEI, G. P. (1962): Supervital mutants of *Arabidopsis*. In: *Genetics*, 47 (4) 443–460 p. <https://doi.org/10.1093/genetics/47.4.443>
- RENAU-MORATA, B., CARRILLO, L., DOMINGUEZ-FIGUEROA, J., DOMINGUEZ-FIGUEROA, J., VICENTE-CARBAJOSA, J., MOLINA, R. V., NEBAUER, S. G. AND

- MEDINA, J. (2020) CDF transcription factors: plant regulators to deal with extreme environmental conditions. In: *Journal of Experimental Botany*, 71 (13) 3803-3815. p. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa088>
- RICHTER, R., BEHRINGER, C., MÜLLER, I.K., SCHWECHHEIMER, C. (2010): The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. In: *Genes and Development*, 24 (18) 2093-104. p. <https://doi.org/10.1101/gad.594910>
- ROSIN, F. M., HART, J. K., HORNER, H. T., DAVIES, P. J., HANNAPEL, D. J. (2003): Overexpression of a *Knotted*-Like Homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. In: *Plant Physiol*, 132 (1) 106–117. p. <https://doi.org/10.1104/pp.102.015560>
- RUTITZKY, M., GHIGLIONE, H. O., CURÁ, J. A., CASAL, J. J., YANOVSKY, M. J. (2009): Comparative genomic analysis of light-regulated transcripts in the Solanaceae. In: *BMC Genomics* 10 60. p. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-60>
- SAMACH, A., ONOUCHI, H., GOLD, S., DITTA, G.S., SCHWARZ-SOMMER, ZS., YANOFSKY, M.F., COUPLAND, G. (2000): Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. In: *Science*, 288 (5471) 1613-1616. p. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1613>
- SAMBROOK, J., FRITCH, E. F., MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning. A LABORATORY MANUAL (2nd edition). In: *Creative Education*, New York, USA.
- SAWA, M., NUSINOW, D. A., KAY, S. A. AND IMAIZUMI, T. (2007): FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. In: *Science*, 316 (5848), 261-265. p. <https://doi.org/10.1126/science.1146994>
- SHARMA, P., LIN, T., HANNAPEL, D. J. (2016): Targets of the *StBEL5* transcription factor include the FT ortholog *StSP6A*. In: *Plant Physiology*, 170 (1) 310–324 p. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01314>
- SHIN, D., MOON, S-J., HAN, S., KIM, B-G., PARK, S.R., LEE, S-L., YOON, H-J., LEE, H.E., KWON H-B., BAEK D., YI B.Y., BYUN M-O. (2011): Expression of *StMYBIR-1*, a novel potato single MYB-like domain transcription factor, increases drought tolerance. In: *Plant Physiology*, 155 (1) 421-432. p. <https://doi.org/10.1104/pp.110.163634>
- SHURE, M., WEESLER, S., FEDOROFF, N. (1983): Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus of maize. In: *Cell*, 35 (1) 225-233. p. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90225-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90225-8)
- SINGH, M., MAS, P. (2018): A functional connection between the circadian clock and hormonal timing in *Arabidopsis*. In: *Genes*, 9 (12) 567. p. <https://doi.org/10.3390/genes9120567>
- SONG, F. H., SMITH R. W., TO, B. J., MILLAR, A. J., IMAIZUMI, T. (2012): FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. In: *Science*, 336 (6084) 1045-9. p. <https://doi.org/10.1126/science.1219644>
- SPOONER, D. M., NUNEZ, J., TRUJILLO, G., HERRERA, M. DEL R., GUZMAN, F., GHISLAIN, M. (2007): Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (49) 19398–19403. p. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709796104>
- STIEKEMA, W. J., HEIDEKAMP, F., DIRKSE, W. G., BECKUM, J., HAAN, P., BOSCH, C., LOUWERSE, J. D. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. In: *Plant Molecular Biology*, 11 255-269. p. <https://doi.org/10.1007/BF00027383>

- SWAIN, S., MYERS, Z.A., SIRIWARDANA, C.L., III. HOLT, B.F. (2017): The multifaceted roles of NUCLEAR FACTOR-Y in *Arabidopsis thaliana* development and stress responses. In: *BBA-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860 (5) 636-44. p. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.10.012>
- TANG, D., JIA, Y., ZHANG, J., LI, H., CHENG, L., WANG, P., BAO, Z., LIU, Z., FENG, S., ZHU, X., LI, D., ZHU, G., WANG, H., ZHOU, Y., BRYAN, G.J., BUELL, C.R., ZHANG, C., HUANG, S. (2022): Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes. In: *Nature*, 606 535-541. p. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04822-x>
- TIAN, F., YANG, D. C., MENG, Y. Q., JIN, J. P., GAO, G. (2019): PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. In: *Nucleic Acids Research*, 48 (D1) 1104-1113. p. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1020>
- TOGURI, T., UMEMOTO, N., KOBAYASHI, O., OHTANI, T. (1993): Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. In: *Plant Molecular Biology*, 23 933-946. p. <https://doi.org/10.1007/BF00021810>
- TU, Z., HE, G., LI, K.X., CHEN, M.J., CHANG, J., CHEN, L., YAO, Q., LIU, D.P., YE, H., SHI, J., WU, X. (2005): An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. In: *Electronic Journal of Biotechnology*, 8 (1). <https://doi.org/10.2225/vol8-issue1-fulltext-8>
- VELLAI, T. (2020): A 2020-as Kémiai Nobel díjmargójára Genomszerkesztés svájci bicskája: a CRISPR/Cas9 rendszer. <https://mta.hu/vii-osztaly/a-2020-as-kemiai-nobel-dijmargojara-111039> Kereső program: Google. Kulcsszavak: mta, CRISPR/Cas9. Lekérdezés időpontja: 2024.01.10.
- VELLAI, T., PERCZEL, A. (2020): A genomszerkesztés svájci bicskája: a CRISPR/Cas9 rendszer. https://mta.hu/tudomany_hirei/a-genomszerkesztes-svajci-bicskaja-a-crisprcas9-rendszer-111113 Kereső program: Google. Kulcsszavak: CRISPR/Cas9. Lekérdezés időpontja: 2024.01.08.
- WANG, Y., LI, L., YE, T., LU, Y., CHEN, X., WU, Y (2013): The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. In: *Journal of Experimental Botany*, 64 (2) 675-684. p. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers361>
- WANG, S., ZHANG, S., WANG, W., XIONG, X., MENG, F., CUI, X. (2015): Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. In: *Plant Cell Reports*, 34 1473-1476. p. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7>
- WEBER, E., ENGLER, C., GRUETZNER, R., WERNER, S., MARILLONNET, S. (2011): A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. In: *PLoS ONE*, 6(2) e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- WENKEL, S., TURCK, F., SINGER, K., GISSOT, L., GOURRIEREC, J.L., SAMACH, A., COUPLAND, G. (2006): CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell*, 18 (11) 2971-2984. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043299>
- WU, J., WANG, Y., WU, S. (2008): Two new clock proteins, LWD1 and LWD2, regulate *Arabidopsis* photoperiodic flowering. In: *Plant Physiology*, 148 (2) 948-959. p. <https://doi.org/10.1104/pp.108.124917>
- XING, H., DONG, L., WANG, H., HAN, C., LIU, B., WANG, X., CHEN, O. (2014): A CRISPR/CAS9 toolkit for multiplex genome editing in plants. In: *BMC Plant Biology*, 14 327. p. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>

YAMAMOTO, T., KASHOJIYA, S., KAMIMURA, S., KAMEYAMA, T., ARIIZUMI, T., EZURA, H., MIURA, K. (2018): Application and development of genome editing technologies to the Solanaceae plants. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 131 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.019>

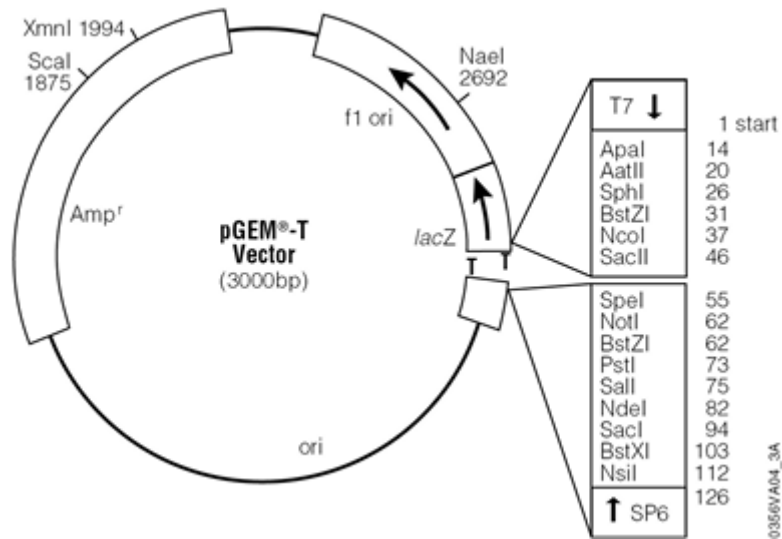
YU., J-W., RUBIO, V., LEE, N-Y., BAI, S., LEE, S-Y., KIM, S-S., LIU, L., ZHANG, Y., IRIGOYEN, M. L., SULLIVAN, J.A., ZHANG, Y., LEE, I., XIE, Q., PAEK, N-C, M DENG, X W. (2008): COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. In: *Molecular Cell* 32 (5) 617-630.p. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.026>

ZHANG, L-Y., BAI, M-Y., WU, J., ZHU, J-Y., WANG, H., ZHANG, Z., WANG, W., SUN, Y., ZHAO, J., SUN, X., YANG, H., XU, Y., KIM, S-H., FUJIOKA, S., LIN, W-H., CHONG, K., LU, T., WANG, Z-Y. (2009): Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell*, 21 (12) 3767-3780. p. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070441>

ZHOU, X., WANG, G., SUTOH, K., ZHU, J.-K., ZHANG, W. (2008): Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis. In: *Biochim Biophys Acta* 1779 (11) 780–788. p. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.04.005>

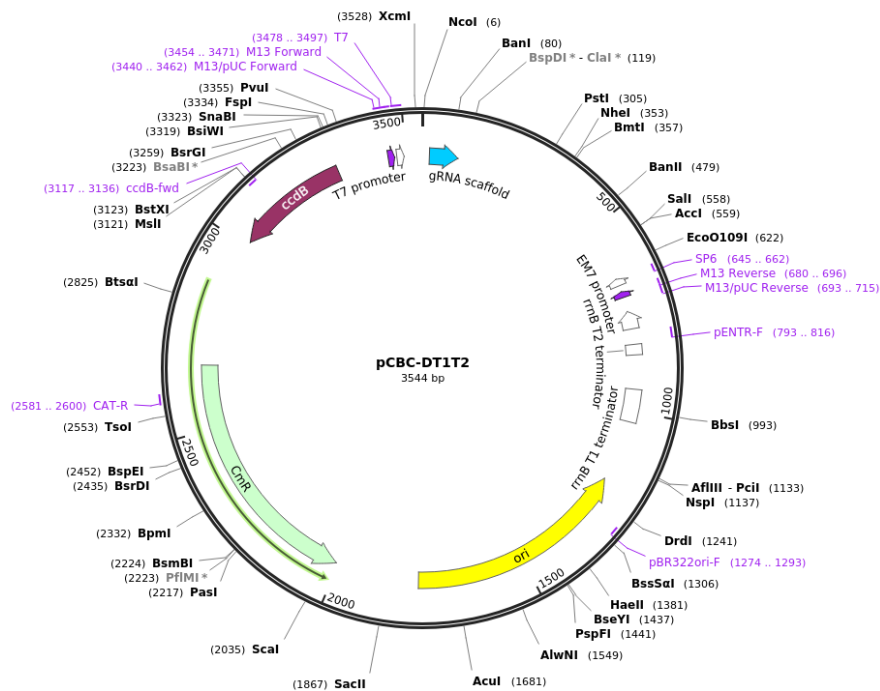
ZIERER, W., RÜSCHER, D., SONNEWALD, U., SONNEWALD, S. (2021): Tuber and tuberous root development. In: *Plant Biology*, 72 551-580. p. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-080720-084456>

M2. A pGEM[®]-T Easy vektor térképe



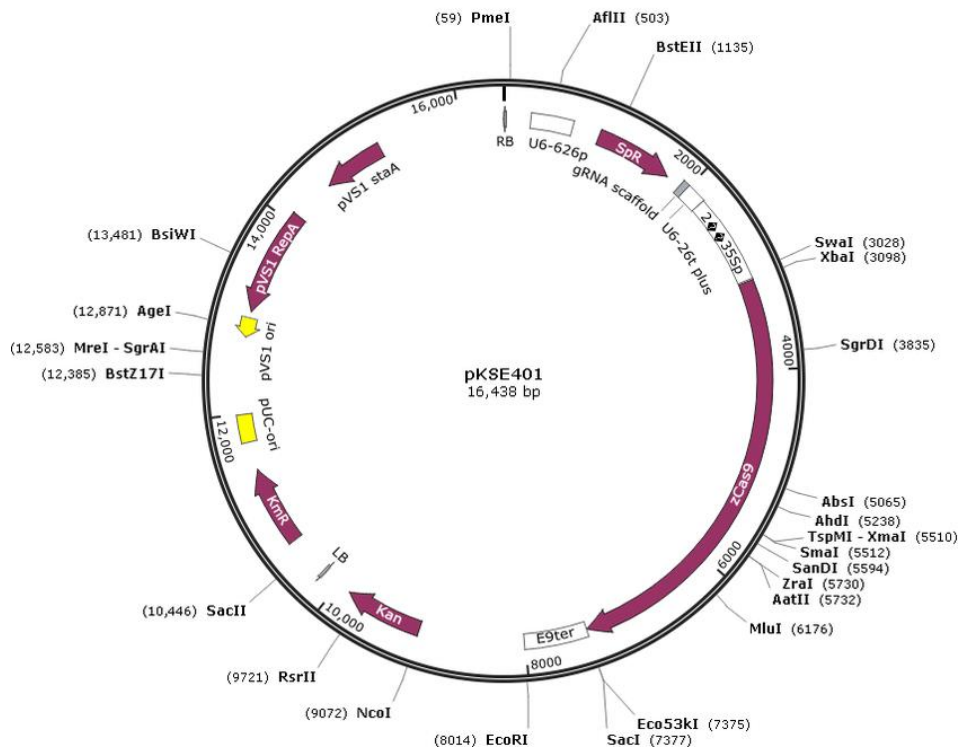
Amp^r, ampicillin rezisztencia gén; f1 ori, F1-fág replikációs origó; lacZ, β-galaktozidáz α-alegység; restriktós enzim felismerőhelyek; ori, replikációs origó (Knoche és Kephart 1999)

M3. A pCBC-DT1T2 vektor térképe



gRNA scaffold, Cas9 kötőhely; EM7 promóter, konstitutív szintetikus prokarióta promóter, ami a T7 promóterből származik és expressziót biztosít *E. coli*-ban; rrnB T2 terminator, rrnB T1 terminator, riboszomális RNS-t kódoló *rrnB* gén terminációs régiója *E. coli*-ban; ori, replikációs origó; CmR, kloramfenikol rezisztencia gén; ccdB, toxikus fehérje, ami DNS-girázként működik; T7 promóter, *E. coli*-ban expressziót biztosító promóter; a körön kívül fekete betűkkel restriktós enzim felismerőhelyek láthatók (Xing et al. 2014)

M4. A pKSE401 vektor térképe



RB, jobb oldali határszekvencia; U6-626p, *E. coli*-ban expressziót biztosító promóter; SpR, spektinomycin rezisztenciát kódoló gén; gRNA scaffold, Cas9 kötőhely; U6-26t plus, U6-26 terminátor; 2X35S, kétszeres CaMV35S promóter; zCas9, *Zea mays* kodon optimalizált CRISPR asszociált nukleáz 9; E9ter, transzkripció terminációs szekvencia; Kan, nptII kanamicin rezisztencia gén; LB, bal oldali határszekvencia; KmR, nptIII kanamicin rezisztencia gén; pUC-ori, replikációs origó *E. coli*-ban; pVS1-ori, replikációs origó *Pseudomonas*-ban; pVS1 RepA, replikációs fehérje a pVS1 plazmidból; pVS1 staA, stabilitás fehérje a pVS1 plazmidból; a körön kívül restrikciós enzim felismerőhelyek láthatók (Xing et al. 2014).

M5. PCR primerek

A primerek tervezéséhez az NCBI primer tervező programját használtuk (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) és az oligókat az Integrated DNA Technologies-től (Leuven, Belgium) rendeltük.

Jelölés	Primer neve	Szekvencia (5'-3')	Felhasználási terület
A	<i>gCDF1</i> gRNS primerek		
	CDF1.1 gRNA1	TTGTGGACTGGCCCTTCCTC	gCDF1 konstrukcióhoz használt gRNS primerek
	CDF1.1 gRNA2	TGTACATTGACCTGTAGAGT	
B	<i>gCDF1</i> primerek		
P1	CDF1.1 3' end FW	ACACTAGGTATCAGGAATGAG	gCDF1 mutáns növények azonosításához használt primerek
P2	CDF1.1 3' end R	TGAGAAGTCAGTAAAACTTCAGCT	
	CDF1 X2 612 FW	GCGGAAACGGTCTCTCTATC	gCDF1 mutánsokban található deléciók térképezéséhez használt primerek
	CDF1 X2 1303 FW	ATGGAACTTGTAGTACAGCC	
	CDF1 X2 1454 FW	ATTCTATCCAGCAACACCGT	
	CDF1 del1 R	TTAACCTATATGCTCTGCG	
	CDF1 del2 R	AAAAAGCTAATGGGGTGAT	
C	<i>GI.04</i> gRNS primerek		
gRNA1	GI04 gRNA1 FW	AAAGAAGCTCGTGCTTGAATGGG	eGI.04 konstrukció gRNS-ei
gRNA2	GI04 gRNA2 R	CTGGTGTACTGTGCAGCTTC	
gRNA5	GI04 gRNA393 Fw	TGCTGTGACAGAATTGCGAA	Az mGI.04 és az mGI.4/12 konstrukciók

gRNA6	GI04 gRNA594 R	TCAGACTCGCTGGAAGCTGG	gRNS-ei
D	GI.04 promóter primerek		
	StGI.04 -816 FW	TAGCTACAATGGTGGCTCCG	GI.04 promóter elemzéshez használt primerek
	StGI.04 -2601 FW	GTGGGTGTGTGCCCAAATA	
	StGI.04 +65 R	TTCCGTTGTTGTGCATCTTGAG	
	StGI.04 -816 R	CGGAGCCACCATTGTAGCTA	
E	GI.04 primerek		
P2	gGI04 test FW	TTGACAAGGCCGAACCATT	Az eGI.04 és az mGI.04 mutánsok DNS szekvencia térképezésére használt primerek
P3	gGI04 test R	CCTATGTGCCTGTCCATTGT	
P1	GI04 +2100 FW	TGTCTGTCACACTCGGAGGA	
	GI04 +2100 R	TCCTCCGAGTGTGACAGACA	
P4	GI04 +2786 R	CTGAGCGGAAGTGCTTTCTG	
	GI04 del1 FW	CCCTGAGGTTGAATGGAGAA	
	GI04 del2 FW	CTGCAGAATCCTTCCAAATCTATC	
	GI04 del3 FW	GTTTCCCCGAGTCGTTGCAT	
P5	GI04 del1 R	AAGTGAGAATGGTCATGGGA	
P6	GI04 del2 R	TGTATCTGGTGTAAGGAACACA	
	GI04 del3 R	CCGAGGTTGCATTTTTGGAT	
	GI04 del.4 R	CCCTACACTAGAGGTGGAGTTC	
	GI04 gRNA1 R	CCATTCAAGCACGAGCTTCTTT	
	GI04 gRNS 393 FW	TGCTGTGACAGAATTGCGAACA	
	GI04 gRNS 594 R	CCAGCTTCCAGCGAGTCTGA	
F	GI.12 gRNS primerek		
gRNA3	GI12 gRNA1 FW	CCTCTGTGTAAAGACTCCTATGA	eGI.12 konstrukció gRNS-ei

gRNA4	GI12 gRNA2 R	AGCAATCTCACTAGAGTGTGAAC	
gRNA7	GI12 gRNA591 FW	GTAGACACTCCGGCAACCAT	Az eGI.12 és az mGI.4/12 konstrukciók gRNS-ei
gRNA8	GI12 gRNA799 R	CATCTAATGAGCTACGAAAC	
G	<i>GI.12</i> promóter primerek		
	StGI.12 -1586 FW	AGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGG	GI.12 promóter elemzéshez használt primerek
	StGI.12 -2837 FW	TTAGACAGCTCCTCCCACTAA	
	StGI.12 +59 R	CTCTGCATCTTGTGGAGGAA	
	StGI.12 -1586 R	CCCAATCGAACGACTTCTTACT	
H	<i>GI.12</i> primerek		
P7	gGI12test Fw	TTGTCAACAAGGCTGAACCATT	Az eGI.12 és az mGI.12 mutánsok DNS szekvencia térképezésére használt primerek
P8	gGI12test R	TCCAAAATGCCTGTCTTTGT	
	GI12 +2094 FW	TGCCGTCTCTCATACTCGGA	
	GI12 +2094 R	TCCGAGTATGAGAGACGGCA	
	GI12 +2794 R	GCGGAAGTGCTTTCTGCAAT	
	GI12 del1 FW	TGCAGAAGCCACAGTAGAAG	
	GI12 del2 FW	TTGGCATATGTGATTACCATTGTTAT	
	GI 12 del3 FW	ACGATTGCTGGTAGGAGTGACT	
	GI12 del1 R	CTTTGAGCGAAGTTCCAAGC	
	GI12 del2 R	AACGGCCATATCATTCTCCAG	
	GI12 del3 R	TGTAAACGTGGAAGAACCAA	
	GI12 del4 R	AGTTATGGAAGATTGTTAGCACC	
	GI 12 gRNA1 R	TCATAGGAGTCTTTACACAGAGGCC	
	GI12 gRNA591 FW	GTAGACACTCCGGCAACCAT	
	GI12 gRNA799 R	ATCCCCTTCGTAGCTCATTAGATG	

M6. A *GI* gének szerkesztésére használt primerek

eGI.04 konstrukció primerei	
GI04-43-DT1-F0	TGAAGAAGCTCGTGCTTGAATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GI04-189-DT2-R0	AACCTGGTGTACTGTGCAGCTTCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
GI04-43-DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGAAGAAGCTCGTGCTTGAATGTT
GI04-189-DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACCTGGTGTACTGTGCAGCTTCAA
eGI.12 konstrukció primerei	
GI12-106-DT1-F0	TGCATAGGAGTCTTACACAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GI12-193-DT2-R0	AACAGCAATCTCACTAGAGTGTCCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
GI12-106- DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGCATAGGAGTCTTACACAGGTT
GI12-193- DT2 BsR	ATTATTGGTCTCGAAACAGCAATCTCACTAGAGTGTCAA
mGI.04 konstrukció primerei	
GI04-393-DT1-F0	TGTCGCAATTCTGTCACAGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GI04-594-DT2-R0	AACCCAGCTTCCAGCGAGTCTGCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
GI04-393-DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGTCGCAATTCTGTCACAGCAGTT
GI04-594-DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACCCAGCTTCCAGCGAGTCTGCAA
mGI.12 konstrukció primerei	
GI12-591-DT1-F0	TGTAGACACTCCGGCAACCATGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
GI12-799-DT2-R0	AACGTTTCGTAGCTCATTAGATCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
GI12-591- DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGTAGACACTCCGGCAACCATGTT
GI12-799- DT2 BsR	ATTATTGGTCTCGAAACGTTTCGTAGCTCATTAGATCAA

Sárga, zöld, rózsaszín és kék színnel a gRNS-ek, piros betűkkel a *BsaI* restrikciós enzim felismerő helye, piros háttérrel a gRNS általunk tervezett módosítása van kiemelve.

M7. *GI.04* és *GI.12* kódoló régiójának szekvenciái

GI04	ATGGCCGCTACATGCGAGAGGTGGATTGATGGCCTTCAATACTCCTCAATATTTTGGCCT	60
GI12	ATGGCTTCTTCAAGCACAAGGTGGATTGATAGTCTTCATTTCTCTTCATTATTTTGGCCT	60
	***** ** ** * ***** * ***** * ** ** ***** *	
GI04	CCCCCTCAAGATGCACAACAACGGAAGGCTCAAATTACTGCCTATGTTGAGTACTTTGGT	120
GI12	CCTCCACAAGATGCAGAGCAGCGGAAGGATCAAATTACCGCGTATGTTAAGTACTTTGGT	120
	** ** ***** * ** ***** ***** ** ***** *****	
GI04	CAGTTCACATCAGAACAATTTCTGAAGATATAGCTGAGCTGATACGGAACCGGTATCCA	180
GI12	CAGTTCACATCAGAACAATTTCTGAAGATATAGCTGAGCTCATAACGGAACCGGTATCCA	180

GI04	TCCAAGGAAAACCGACTTTTTGATGATGTTTTAGCGACTTTTGTCTTCACCACCCAGAG	240
GI12	TCAAGGAGAACCGACTTTTTGATGATGTTTTAGCAACTTTTGTCTTCATCACCCGGAG	240
	** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **	
GI04	CATGGGCATACTGTAATTCTTCCAATTATTTTCATGCATCATCGATGGCACACTGGACTAT	300
GI12	CATGGGCATGCTGTAGTTCATCCAATTATTTTCATGCATCATCGATGGTACACTGGAGTAT	300
	***** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** **	
GI04	GATAAAAGTTGTCCACCTTTTCACTTCTTTTATATCATTGGTTTGCCCAAGCAGTGAGAAG	360
GI12	GATAAAAGTAGTCCACCTTTTGTCTTCTTTTATATCATTGGTTTGCTCAAGGAGTGAGAAG	360
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
GI04	GAATATTGAGAACAGTGGGCTCTTGCATGTGGAGAGATTTACGAATTTTGACACATTAC	420
GI12	GAATATTCTGAACAATGGGCTCTTGCATGTGGAGAGATTTACGTATACTAACACACTAC	420
	***** ***** ***** ***** ***** ***** * * ***** **	
GI04	AACCGTCCGATCTACAAAGTTGTGCAACAGGGTGGCGAAGCAGACAGAAGCAGCCGAGGA	480
GI12	AACCGCCCAATTTTCAAAGTTGATCGTCAGGACAATGGAACAGATAGAAGCACCAGTGA	480
	***** ** ** * ***** * ***** * * ***** ***** * * **	
GI04	ATCCATGCTTCAACAAGTAAATCTGCTGATAGTGAACCTAGTATGCCTTCAGTGCATCAT	540
GI12	AGCCACACTTCAACAAGTAAATCTTCTGCTGATAGTGAACCTGGTGTGCCTTCTATACAACAT	540
	* ** ***** * ***** ** ***** * ** **	
GI04	GAGAGGAAAACGCTGAGGCCGTTGTCTCCATGGATTACTGATATACTGCTCGCCGCACCT	600
GI12	GAGAGAAAACCTATAAGACCATTGTCTCCATGGATCACTGATATATTGCTTGCTGCGCCA	600
	***** ** * * ** * ***** ***** ***** ** ** *	
GI04	CTAGGTATTAGAAGTGATTACTTCCGTTGGTGTGGTGGTGTATGGGAAAGTATGCTTCT	660
GI12	CTAGGGATTAGAAGCGATTACTTCCGTTGGTGTGGCGGTGTATGGGAAAGTATGCTGCT	660
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **	
GI04	GGAGAACTAAAGCCACCATCAACTGCTTCTTCTCGTGGCTCTGGAAAGCATCCTCAGTTA	720
GI12	GGAGATCTCAAGCCCCATCAAGTGTGCTTCTCGTGGTCTGGGAAGCATCCACAACCTA	720
	***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** *	
GI04	ATCCCTTCAACTCCGAGGTGGGCAGTTGCCAATGGTGTGCTGGTGTATTTAAGTGTGTTGT	780
GI12	CTGCCTGCAACTCCAAGGTGGGCTGTTGCTAATGGTGTGCTGGCGTTATTTAAGTGTGTTGT	780
	* ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
GI04	GATGAAGAAGTTGCTCGTTATGAGACTGCTACCTTGACTGCAGCTGCCGTTCTGCTCTT	840
GI12	GATGAGGAAGTTTCTCGCTACGAGACTGCTACCTTGACTGCAGCCGCTGTTCTGCACTT	840
	***** ***** ** ** ***** ***** ***** ** ***** **	
GI04	CTGCTTCCACCTCCTACAACACTATGGATGAGCATCTTGTGTCAGGGCTACCAGCACTT	900
GI12	CTGCTTCCACCTCCAACAACGCCTATGGATGAGCACCTCGTTGCAGGACTACCACCACTT	900
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
GI04	GAGCCGTATGCACGATTGTTTCATCGATACTATGCAATTGCTACTCCAAGTGCCACCCAG	960
GI12	GAGCCATATGCACGTTTATTTTCATCGATACTATGCAATTGCAAGTCCAAGTGCCACACAG	960

GI04 AGGCTTCTTCTTGGACTTCTAGAAGCTCCACCATCTGGGCTCCAGATGCACTTGATGCT 1020
GI12 AGGCTTCTTGTGGACTTTTAGAAGCTCCACCATCTTGGGCTCCGGATGCACTTGATGCT 1020

GI04 GCTGTTACAGCTAGTGGAACTTCTTCGAGCAGCTGAAGATTATACTTCTGGCTTGCGGCTT 1080
GI12 GCGGTACAACCTAGTGGAACTTCTGCGAGCAGCTGAAGATTATGCATCTGGATTGCGTCTT 1080
** ** * ***** * ***** **

GI04 CCTAGGAATTGGATGCATTTGCATTTCTTGCCTGCAATTGGAATTGCCATGTCCATGAGA 1140
GI12 CCTAGGAATTGGATGCACTTGCATTTCTTGCCTGCAATTGGAATTGCCATGTCCATGAGA 1140

GI04 GCAGGCATTGCTGCAGATGCTGCAGCTGCTTTACTTTTCCGAGTACTTTCACAGCCTGCT 1200
GI12 GCAGGAATTGCTGCAGATTCTGCAGCAGCTTTACTTTTCCGAGTACTTTCACACCTGCT 1200

GI04 CTGCTCTTTCCTCCATTAAGGCAAGTTGAAGGAATTGAAGTTCAACACGAACCACTGGGT 1260
GI12 TTGCTATTCCTCCCTTGGAGCAAATTGAAGAAATTGAAGTTCAACATGAACCTCTGGGT 1260
*** ** * *****

GI04 GGCTATATTTTCATGCGATAAAAAAGCAGAGACAAGTGCCCTTTAGCAGAAGCCACAGTTGAA 1320
GI12 GGCGACACTTCATGTAATAAAAAAGCAGAGAGAAGTGACTGCTGCAGAAGCCACAGTAGAA 1320
*** * * *****

GI04 GCCACTGCGCAAGGGATTGCATCAATGCTTTGTGCACATGGCCCTGAGGTTGAATGGAGA 1380
GI12 GCCACTGCCCAAGGGATTGCATCAATGCTTTGTGCACATGGTCCGGAGGTTGAATGGAGA 1380

GI04 ATATGTACCATATGGGAAGCTGCTTATGGCTTGATTCCCTTTGAGTTCATCAGCTGTTGAT 1440
GI12 ATATGTACCATCTGGGAAGCTGCTTATGGATTGATTCCCTTTAAGTTCATCTGCAGTTGAT 1440

GI04 CTACCTGAAATTATAGTTGCCACCCCTCTGCAACCACCTGTTTTATCATGGAACCTGTAT 1500
GI12 CTCCTGAGATTGTAGTTGCCACCCCTTTACAACCACCCATTTTGTGCATGGAACCTGTAT 1500
** *****

GI04 ATACCACTACTAAAGGTTCTTGAGTATCTTCCTCGTGGGAGTCCATCTGAAACTTGCCTC 1560
GI12 ACACCCCTTCTTAAGGTTCTTGAGTATCTTCCTCGTGGGAGTCCATCTGAAACTTGTCTT 1560
* ** * ** *****

GI04 ATGAAAATATTTGTGGCCACGGTAGAAGCAATTCTTCAGAGAACATTCCCATCTGAGTCC 1620
GI12 ATGAAAATATTTGTGCAACCGTGAAGCAATTCTTCAGAGAACGTTCCCGCCTGATTCC 1620

GI04 TCTAGAGAGGAAATCAGAAGAAACAGATACAACATGTTTGGATCTGCCTCCAAAAACCTT 1680
GI12 TCTAGAGAAGAAACCAGAAAAACCAGATA---TGTTTTCGGCCCTGCCTTCAAAAAATCTT 1677

GI04 GCTGTGACAGAATTGCGAA CAATGGTTCATTGTTCTTGGAGTCGTGTGCTTCTGTA 1740
GI12 GCTGTGGCAGAACTGCGAACCATGGTTCATTGTTCTTGGAGTCATGTGCCCTCTGTT 1737

GI04 GAGCTTGCTTCTCGGCTTCTTTTTGTTGTATTAAGTGTATGTGTCACCCATGAAGCAAAA 1800
GI12 GAGCTTGCATCTCGACTACTTTTTGTTATCTTAACAGTATGTGTCAGTCATGAAGCAAAA 1797

GI04 ACAAATGGGAGCAGAAGACCTGTAGGTGAAGATCCTCACCATCCTAGTGAAATGGGT TCA 1860
GI12 CCAAATGGGAATAAAAAGGCCTAAAGGTGAAGATTCTCACCCACCTAGTGAAATCGGG GTA 1857

GI04 GACTCGCTGGAAGCTGG TGGAAAGCAGAAAGAAAAAATCCCAAGAAAGTGAAAAAACAA 1920
GI12 GACACTCCGGCAACCAT CGGAAACAAAGACCAATAGGAAGTAAGAAAGTGAAAAAACAA 1917


```

** *****
GI04 GCTGCTACAGCCATTGTTCTTCAGGCGGACAAGGAATTGCAACCATGGATTGCCAAAGAT 2925
GI12 GCTGCAACAGCCATTGTTCTTCAGGCTGAGAGGGAATTGCAACCATGGATTGCTAAAGAC 2937
*****

GI04 GATGATCTTGGTCAGAAGATGTGGAGGATAAACCAACGAATTGTGAAATTGATTGCAGAA 2985
GI12 GATGACCTTGGTCAGCAAATGTGGAGAATTAACCAACGTATAGTAAAATTGATCGCAGAA 2997
*****

GI04 GTAATGAGGAATCATGATACACCAGAATCTTTGGTTATTCTTGCTAGCGCACCAGACCTC 3045
GI12 CTGATAAGGAATCATGATATAGCAGAATCTTTGGTAATTCTGGCTAGTAACCCAGACCTC 3057
* ** *****

GI04 CTCTTACGGGCAACAGATGGGATGCTTGTAGATGGAGAAGCATGCACCTTACCACAGCTG 3105
GI12 CTTTTACGGGCCACAGATGGGATGCTTGTTCGATGGAGAAACATGCACCTTACCACAGCTG 3117
** *****

GI04 GAGCTCCTGGAAGTGACAGCTAGAGCTGTACAACCAATGCTTGAGTGGGGAGAATCTGGA 3165
GI12 GAGCTTTTGAAGTGACAGCTAGAGCAATTCAACCAGTGCTTGACTGGGGAGAATCTGGA 3177
*****

GI04 TCATCAATCGTTGATGGTCTGTCAAACCTGTTGAAGTGCCGCTTACCGGCCACAGTTCAT 3225
GI12 CAGTCAGTTGCTGATGGCCTCACAAACCTATTGAAGTGTCGCTTACCTGCCACAGTTCGC 3237
*** * * *****

GI04 TGTATTTCTCATCCAAGTGCTATCGTACGTGCACTCAGCATATCACTTCTCCGTGCCATT 3285
GI12 TGTGTTTCTCATCCAAGTGACATGTCCGTGCTCTCAGTACATCAGTTCTTCGTGACATT 3297
*** *****

GI04 ATGCATACTGGTTCAATAAAAACTAGAGCTAAAC---GAGCTGATGTAAATGGTATCCAT 3342
GI12 ATGTATGCTGGTTTCAGTAAAACCAAGTGCCAAACAAGCAGCAGATGTAAATGGCATCCAC 3357
*** ** *****

GI04 GGTCTGCTTATAAGTACTTAAACATTGGCACTATTAACCTGGCAAAGGGATATCGAGAAG 3402
GI12 AATCCTGCTTATCAGTACCTTGGCATAAGCATCAGTGACTGGAAAGCGGATATTGAGAAG 3417
*****

GI04 TGTTTGACGTGGGAAGCTAACAGCCGAATTGAAAATGGAATGTGTACAGAATTTCTTGAT 3462
GI12 TGTTTGATGTGGGAAGCTAATAGCCGGCTTGAAAATGGAATGTCTGCTCAATTTCTTGAT 3477
*****

GI04 ATGGCTGCTAAGGAATTAGGGTGTACTATATTCATTTG- 3500
GI12 ACTGCTGCTAGGGAATTAGGCTGTACTATATCAGTCTGA 3516
* *****

```

Rózsaszínnel az mGI.04, kékkel az mGI.12, sárgával az eGI.04, zölddel az eGI.12 konstrukciókban található gRNS-ek vannak kiemelve.

M8. *Gl.04* promóter szekvencia

StGl.04 promóter disztális

GI04.7	GTGGGTGTGTGCCCAAATATTATTGGAAAAAGGAATAACGGTATTTGGAGAAGAAAATT	60
GI04.2	GTGGGTGTGTGCCCAAATATTATTGGAAAAAGGAATAACGGTATTTGGAGAAGAAAATT	60
GI04.6	GTGGGTGTGTGCCCAAATATTATTGGAAAAAGGAATAACGGTATTTGGAGAAGAAAATT	60
<i>S. ph</i>	GTGGGTGTGTGCCCAAATATTATTGGAAAAAGGAATAACGGTATTTGGAGAAGAAAATT	60
GI04.1	GTGGGTGTGTGCCCAAATATTATTGGAAAAAGGAATAACGGTATTTGGAGAAGAAAATT *****	60
GI04.7	AAAGGAAACGGTTTCTAGACATTTCTGCAATGAATAGATATTTGGAGAAGACAATGGT	120
GI04.2	AAAGGAAACGGTTTCTAGACATTTCTGCAATGAATAGATATTTGGAGAAGACAATGGT	120
GI04.6	AAAGGAAACGGTTTCTAGACATTTCTGCAATGAATAGATATTTGGAGAAGACAATGGT	120
<i>S. ph</i>	AAAGGAAACGGTTTCTAGACATTTCTGCAATGAATAGATATTTGGAGAAGACAATGGT	120
GI04.1	AAAGGAAACGGTTTCTAGACATTTCTGCAATGAATAGATATTTGGAGAAGACAATGGT *****	120
GI04.7	GGGGGTGGGGGACGGGGTAGGGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAAAAAATATTATTG	180
GI04.2	GGGGGTGGGGGACGGGGTAGGGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAAAAAATATTATTG	179
GI04.6	GGGGGTGGGGGACGGGGTAGGGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAAAAAATATTATTG	180
<i>S. ph</i>	GGGGGTGGGGGACGGGGTAGGGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAAAAAATATTATTG	180
GI04.1	GGGGGTGGGGGACGGGGTAGGGGTGTTTTTTTTTTTTTTTTT ATAAAAAATATTATTG *****	179
GI04.7	GGCAAAAATCCATATGTCATTGATTCATTGGTTACTTTTTATTTTTATTCAAAAATAAATT	240
GI04.2	GGCAAAAATCCATATGTCATTGATTCATTGGTTACTTTTTATTTTTATTCAAAAATAAATT	239
GI04.6	GGCAAAAATCCATATGTCATTGATTCATTGGTTACTTTTTATTTTTATTCAAAAATAAATT	240
<i>S. ph</i>	GGCAAAAATCCATATGTCATTGATTCATTGGTTACTTTTTATTTTTATTCAAAAATAAATT	240
GI04.1	GGCAAAAATCCATATGTCATTGATTCATTGGTTACTTTTTATTTTTATTCAAAAATAAATT *****	239
GI04.7	ATTTAAGAATTGTTTTTGATGCAAAATGACAAATGTCGTCGTTAATTTGTCACCTTACAC	300
GI04.2	ATTTAAGAATTGTTTTTGATGCAAAATGACAAATGTCGTCGTTAATTTGTCACCTTACAC	299
GI04.6	ATTTAAGAATTGTTTTTGATGCAAAATGACAAATGTCGTCGTTAATTTGTCACCTTACAC	300
<i>S. ph</i>	ATTTAAGAATTGTTTTTGATGCAAAATGACAAATGTCGTCGTTAATTTGTCACCTTACAC	300
GI04.1	ATTTAAGAATTGTTTTTGATGCAAAATGACAAATGTCGTCGTTAATTTGTCACCTTACAC *****	299
GI04.7	GTCATTCGCGAGTGAACACACACCTTATATATTTTTGTTGATTGGTAAAAGAGTGTCAA	360
GI04.2	GTCATTCGCGAGTGAACACACACCTTATATATTTTTGTTGATTGGTAAAAGAGTGTCAA	359
GI04.6	GTCATTCGCGAGTGAACACACACCTTATATATTTTTGTTGATTGGTAAAAGAGTGTCAA	360
<i>S. ph</i>	GTCATTCGCGAGTGAACACACACCTTATATATTTTTGTTGATTGGTAAAAGAGTGTCAA	360
GI04.1	GTCATTCGCGAGTGAACACACACCTTATATATTTTTGTTGATTGGTAAAAGAGTGTCAA *****	359
GI04.7	AATGACACATTAAGACTCTACATGAAGTGTCTAAAATAAATATCGTCCGGTTAAGATGTC	420
GI04.2	AATGACACATTAAGACTCTACATGAAGTGTCTAAAATAAATATCGTCCGGTTAAGATGTC	419
GI04.6	AATGACACATTAAGACTCTACATGAAGTGTCTAAAATAAATATCGTCCGGTTAAGATGTC	420
<i>S. ph</i>	AATGACACATTAAGACTCTACATGAAGTGTCTAAAATAAATATCGTCCGGTTAAGATGTC	420
GI04.1	AATGACACATTAAGACTCTACATGAAGTGTCTAAAATAAATATCGTCCGGTTAAGATGTC *****	419
GI04.7	TAAGTGAAACTTCGTGTCAACTTTAAGGGGCCACTGATGGGTTAGACCTATGGGTGTTTG	480
GI04.2	TAAGTGAAACTTCGTGTCAACTTTAAGGGGCCACTGATGGGCTAGACCTATGGGTGTTTG	479
GI04.6	TAAGTGAAACTTCGTGTCAACTTTAAGGGGCCACTGATGGGTTAGACCTATGGGTGTTTG	480
<i>S. ph</i>	TAAGTGAAACTTCGTGTCAACTTTAAGGGGCCACTGATGGGTTAGACCTATGGGTGTTTG	480
GI04.1	TAAGTGAAACTTCGTGTCAACTTTAAGGGGCCACTGATGGGTTAGACCTATGGGTGTTTG *****	479
GI04.7	TCATGGGTGCATGTCATGATGATTTCATGATGGTGTGAATCATATGACACATGGCCATTA	540
GI04.2	TCATGGGTGCATGTCATGACGATTCATGGTGGTGTGAATCATATGACACATGGCCATTA	539
GI04.6	TCATGGGTGCATGTCATGATGATTTCATGATGGTGTGAATCATATGACACATGGCCATTA	540
<i>S. ph</i>	TCATGGGTGCATGTCATGATGATTTCATGATGGTGTGAATCATATGACACATGGCCATTA	540
GI04.1	TCATGGGTGCATGTCATGATGATTTCACGATGGTGTGAATCATATGACACATGGCCATTA *****	539
GI04.7	AGTGCCTAAGAAAAATATCTCAATGCCACGCTGCAAAATCTGAAGGAAGAGGGAGAGCTC	600
GI04.2	AGTGCCTAAGAAAAATATCTCAATGCCACGCTGCAAAATCTGAAGGAAGAGGGAGAGCTC	599
GI04.6	AGTGCCTAAGAAAAATATCTCAATGCCACGCTGCAAAATCTGAAGGAAGAGGGAGAGCTC	600

<i>S. ph</i>	AGTGCCTAAGAAAAATATCTCAATGCCACGTCTGCAAATCTGAAGGAAGAGGGAGAGCTC	600
GI04.1	AGTGCCTAAGAAAAATATCTCAATGCCACGTCTGCAAATCTGAAGGAAGAGGGAGAGCTC *****	599
GI04.7	AGCTAAAGATCTCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTTCACATTCATTTCTTTTCTCTCTACTTTT	660
GI04.2	AGCTAAAGATCTCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTTCACATTCATTTCTTTTCTCTCTACTTTT	659
GI04.6	AGCTAAAGATCTCTTCTCTTCTTCTTCTTCTTTCACATTCATTTCTTTTCTCTCTACTTTT	660
<i>S. ph</i>	AGCTAAAGATCTCTTCTCTTCTTCTTCTTTCACATTCATTTCTTTTCTCTCTACTTTT	660
GI04.1	AGCTAAAGATCTCTTCTCTTCTTCTTCTTTCACATTCATTTCTTTTCTCTCTACTTTT *****	659
GI04.7	TTCTCCAACCAAAACCTGTTAAACAATCTTCTTCAAATTTTCACCTTCCAATTTTCAGGTA	720
GI04.2	TTCTCCAACCAAAACCTGTTAAACAATCTTCTTCAAATTTTCACCTTCCAATTTTCAGGTA	719
GI04.6	TTCTCCAACCAAAACCTGTTAAACAATCTTCTTCAAATTTTCACCTTCCAATTTTCAGGTA	720
<i>S. ph</i>	TTCTCCAACCAAAACCTGTTAAACAATCTTCTTCAAATTTTCACCTTCCAATTTTCAGGTA	720
GI04.1	TTCTCCAACCAAAACCTGTTAAACAATCTTCTTCAAATTTTCACCTTCCAATTTTCAGGTA *****	719
GI04.7	CCATTTTTTTCTTTAATTTTCTTCTATAACCTCTGAATTTTTTTCTAGTTGTTTTAAAGCT	780
GI04.2	CCATTTTTTTCTTTAATTTTCTTCTATAAC-TCTGAATTTTTTTCTAGTTGTTTTAAAGCT	778
GI04.6	CCATTTTTTTCTTTAATTTTCTTCTATAAC-TCTGAATTTTTTTCTAGTTGTTTTAAAGCT	779
<i>S. ph</i>	CCATTTTTTTCTTTAATTTTCTTCTATAAC-TCTGAATTTTTTTCTAGTTGTTTTAAAGCT	779
GI04.1	CCATTTTTTTCTTTAATTTTCTTCTATAAC-TCTGAATTTTTTTCTAGTTGTTTTAAAGCT ***** **	778
GI04.7	CCGTTTTCTCTA-TGGGATTTGTAATTAATATCTTCNTGCTGTTGTTGATTTGNNAATAAC	839
GI04.2	-CCGTTTTCTCTA-TGGGATTTGTAATTAATATCTC--TGCTGTTGTTGATTTGTTATAAC	834
GI04.6	TCCGTTTTCTCTA-TGGGATTTGTAATTAATATCTC--TGCTGTTGTTGATTTGTTATAAC	837
<i>S. ph</i>	-CCGTTTTCTCTA-TGGGATTTGTAATTAATATCTC--TGCTGTTGTTGATTTGTTATAAC	835
GI04.1	-CCGTTTTCTCTA-TGGGATTTGTAATTAATATCTC--TGCTGTTGTTGATTTGTTATAAC * ***** ***** ***** *****	834
GI04.7	TTTTCTTGCCTTTTGCCTCAGTTCATAATGAAATTNNGNTTAGGAAAGTATGGAGATTCG	899
GI04.2	TT-TCTTGC-TTTTGCCCTCAGTTCATAATGAAA-TTGGTT-AGGAA-GTATGAGA-TTCG	887
GI04.6	TT-TCTTGC-TTTTGCCCTCAGTTCATAATGAAA-TTGGNTTAGGGAAGTATGGAGATTCG	894
<i>S. ph</i>	TT-TCTTGC-TTTTGCCCTCAGTTCATAATGAAA-TTGGTT-AGGAA-GTATGGAGATTCG	890
GI04.1	TT-TCTTGC-TTTTGCCCTCAGTTCATAATGAAA-TTGGTT-AGGAA-GTATGGAGATTCG ** ***** ***** ***** ** * * ** * ***** ****	889
GI04.7	CTTTTTGTTGATCAAGAGAAATATATGTTGTTAATAAGGTTATTACAAATATTTATTGGA	959
GI04.2	CTTTTTTN-TGATCAAGAGAAATATATNT-GTTAATAAGGTTATTACAAATATTTATTGGA	947
GI04.6	CTTTTTGTTGATCAAGAGAAATATATGTTGTTAATAAGGTTATTACAAATATTTATTGGA	954
<i>S. ph</i>	CTTTTTGTTGATCAAGAGAAATATATGTTGTTAATAAGGTTATTACAAATATTTATTGGA	950
GI04.1	CTTTTTGTTGATCAAGAGAAATATATGTTGTTAATAAGGTTATTACAAATATTTATTGGA ***** ***** ***** ***** *****	949
GI04.7	ACTAAAATGTTATTCCA-GTAATTTGGAATTTATAGAATTGTTGAGTTTACCAAACATT	1018
GI04.2	ACTAAAATGTTATTNCCAGTAATTTGGAATTTATAGAATTGTTGAGTTTACCAAAC-AT	1006
GI04.6	ACTAAAATGTTATTCCA-GTAATTTGGAATTTATAGAATTGTTGAGTTTACCAAACATT	1013
<i>S. ph</i>	ACTAAAATGTTATTCCA-GTAATTTGGAATTTATAGAATTGTTGAGTTTACCAAACATT	1009
GI04.1	ACTAAAATGTTATTCCA-GTAATTTGGAATTTATAGAATTGTTGAGTTTACCAAACATT ***** * ***** ***** ***** ***** *	1008
GI04.7	TTTTTTTTCGGATTTCCACTTGGTGTCTTGTACTCACATTGGAAGCCGACTAAATCCGTAG	1078
GI04.2	TTTTTTTTGGATTTCCACTTGGTGTCTTGTACTCACATTGGAAGCCGACTAAATCCGTAG	1066
GI04.6	TTTTTTTTGGATTTCCACTTGGTGTCTTGTACTCACATTGGAAGCCGACTAAATCCGTAG	1073
<i>S. ph</i>	TT-TTTTTGGATTTCCACTTGGTGTCTTGTACTCACATTGGAAGCCGACTAAATCCGTAG	1068
GI04.1	TT-TTTTTGGATTTCCACTTGGTGTCTTGTACTCACATTGGAAGCCGACTAAATCCGTAG ** **** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1067
GI04.7	GTTCCATTTTTTTGGGGAGACTCTGCCAAAAGGTTTTTTTTCTATTCCCTGAGGGTTCGAATA	1138
GI04.2	GTTCCATTTTTTTGGGGAGACTCTGCCAAAAGGTTTTTTTTCTATTCCCTGAGGGTTCGAATA	1126
GI04.6	GTTCCATTTTTTTGGGGAGACTCTGCCAAAAGGTTTTTTTTCTATTCCCTGAGGGTTCGAATA	1133
<i>S. ph</i>	GTTCCATTTTTTTGGGGAGACTCTGCCAAAAGGTTTTTTTTCTATTCCCTGAGGGTTCGAATA	1128
GI04.1	GTTCCATTTTTTTGGGGAGACTCTGCCAAAAGGTTTTTTTTCTATTCCCTGAGGGTTCGAATA ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	1127
GI04.7	CAAAAGTCTTATTAAGGGTGGAGGGATCTCAACCATGCCACACAATTCACGTTGCTAGTT	1198
GI04.2	CAAAAGTCTTATTAAGGGTGGAGGGATCTCAACCATGCCACACAATTCACGTTGCTAGTT	1186
GI04.6	CAAAAGTCTTATTAAGGGTGGAGGGATCTCAACCATGCCACACAATTCACGTTGCTAGTT	1193
<i>S. ph</i>	CAAAAGTCTTATTAAGGGTGGAGGGATCTCAACCATGCCACACAATTCACGTTGCTAGTT	1188

GI04.1	CAAAAGTCTTATTAAGGGTGGAGGGATCTCAACCATGCCACACAATTCACGTTGCTAGTT *****	1187
GI04.7	TTACAGTTGAATAGATTCTGTCCATTGTATTCCCTATGCCTATTTATACATATGTTTTTT	1258
GI04.2	TTACAGTTGAATAGATTCTGTCCATTGTATTCCCTATGCCTATTTATACATATGTTTTTT	1246
GI04.6	TTACAGTTGAATAGATTCTGTCCATTGTATTCCCTATGCCTATTTATACATATGTTTTTT	1253
<i>S. ph</i>	TTACAGTTGAATAGATTCTGTCCATTGTATTCCCTATGCCTATTTATACATATGTTTTTT	1248
GI04.1	TTACAGTTGAATAGATTCTGTCCATTGTATTCCCTATGCCTATTTATACATATGTTTTTT *****	1247
GI04.7	TACTTGCTAATGTTTTCCCTAGATTGATTTTCATACTGTCCAAGTTTACTTTGAATATAGC	1318
GI04.2	TACTTGCTAATGTTTTCCCTAGATTGATTTTCATACTGTCCAAGTTTACTTTGAATATAGC	1306
GI04.6	TACTTGCTAATGTTTTCCCTAGATTGATTTTCATACTGTCCAAGTTTACTTTGAATATAGC	1313
<i>S. ph</i>	TACTTGCTAATGTTTTCCCTAGATTGATTTTCATACTGTCCAAGTTTACTTTGAATATAGC	1308
GI04.1	TACTTGCTAATGTTTTCCCTAGATTGATTTTCATACTGTCCAAGTTTACTTTGAATATAGC *****	1307
GI04.7	TCGTTATGGACTGGTGCTTACTTGAAAACCTCTTAGTATATTAGTTAAAGATATAACCACT	1378
GI04.2	TCGTTATGGACTGGTGCTTACTTGAAAACCTCTTAGTATATTAGTTAAAGATATAACCACT	1366
GI04.6	TCGTTATGGACTGGTGCTTACTTGAAAACCTCTTAGTATATTAGTTAAAGATATAACCACT	1373
<i>S. ph</i>	TCGTTATGGACTGGTGCTTACTTGAAAACCTCTTAGTATATTAGTTAAAGATATAACCACT	1368
GI04.1	TCGTTATGGACTGGTGCTTACTTGAAAACCTCTTAGTATATTAGTTAAAGATATAACCACT *****	1367
GI04.7	AGAGTATTATTAGAGCAAAGGCGGAGTCGAGGATTTTATAGTTTATAGATTTTGAATCACA	1438
GI04.2	AGAGTATTATTAGAGCAAAGGCGGAGTCGAGGATTTTATAGTTTATAGATTTTGAATCACA	1426
GI04.6	AGAGTATTATTAGAGCAAAGGCGGAGTCGAGGATTTTATAGTTTATAGATTTTGAATCACA	1433
<i>S. ph</i>	AGAGTATTATTAGAGCAAAGGCGGAGTCGAGGATTTTATAGTTTATAGATTTTGAATCACA	1428
GI04.1	AGAGTATTATTAGAGCAAAGGCGGAGTCGAGGATTTTATAGTTTATAGATTTTGAATCACA *****	1427
GI04.7	ATCCATTTTTTTT-TTTTTACCCTCCCTAGGAGCTCCCACCCCTTTTGCTCCCTTGGTGAC	1497
GI04.2	ATCCATTTTTTTT---TTTTACCCTCCCTAGGAGCTCCCACCCCTTTTGCTCCCTTGGTGAC	1483
GI04.6	ATCCATTTTTTTTTTTTTTTTACCCTCCCTAGGAGCTCCCACCCCTTTTGCTCCCTTGGTGAC	1493
<i>S. ph</i>	ATCCATTTTTTTT-TTTTTACCCTCCCTAGGAGCTCCCACCCCTTTTGCTCCCTTGGTGAC	1487
GI04.1	ATCCATTTTTTTT---TTTTACCCTCCCTAGGAGCTCCCACCCCTTTTGCTCCCTTGGTGAC *****	1485
GI04.7	TCGAACTCGCAACCTTCGGGTTGGAAGTGAGGGGTGCTTACCATCCGAGCAACTCCCTCT	1557
GI04.2	TCGAACTCGCAACCTTCGGGTTGGAAGTGAGGGGTGCTTACCATCCGAGCATCTCCCTCT	1543
GI04.6	TCGAACTCGCTACCTTCGGGTTGGAAGTGAGGGGTGCTTACCATCCGAGCAACTCCCTCT	1553
<i>S. ph</i>	TCGAACTCGCAACCTTCGGGTTGGAAGTGAGGGGTGCTTACCATCCGAGCAACTCCCTCT	1547
GI04.1	TCGAACTCGCAACCTTCGGGTTGGAAGTGAGGGGTGCTTACCATCCGAGCAACTCCCTCT *****	1545
GI04.7	TGTCACAATCCATTTTGCTTACTGGGTTTTGGATACATTATTTTTTTGATCAGATAAATG	1617
GI04.2	TGTCACAATCCATTTTGCTTACTGGGTTTTGGATACATTATTTTTTTGATCAGATAAATG	1603
GI04.6	TGTCACAATCCATTTTGCTTACTGGGTTTTGGATACATTACTTTTTTTGATCAGATAAATG	1613
<i>S. ph</i>	TGTCACAATCCATTTTGCTTACTGGGTTTTGGATACATTATTTTTTTGATCAGATAAATG	1607
GI04.1	TGTCACAATCCATTTTGCTTACTGGGTTTTGGATACATTATTTTTTTGATCAGATAAATG *****	1605
GI04.7	ATTTTATAAATAAAGGGGCAAAGCCGTATACCATAAGTAGAGAACCCACAACAAAATATG	1677
GI04.2	ATTTTATAAATAAAGGGGCAAAGCCGTATACCATAAGTAGAGAACCCACAACAAAATATG	1663
GI04.6	ATTTTATAAATAAAGGGGCAAAGCCGTATACCATAAGTAGAGAACCCACAACAAAATATG	1673
<i>S. ph</i>	ATTTTATAAATAAAGGGGCAAAGCCGTATACCATAAGTAGAGAACCCACAACAAAATATG	1667
GI04.1	ATTTTATAAATAAAGGGGCAAAGCCGTATACCATAAGTAGAGAACCCACAACAAAATATG *****	1665
GI04.7	TTTCTCTATGAATGAAACCAATCATCTGTAGGAACACCAAACATAAACTAAAAACAAAAG	1737
GI04.2	TTTCTCTATGAATGAAACCAATCATCTGTAGGAACACCAAACATAAACTAAAAACAAAAG	1723
GI04.6	TTTCTCTATGAATGAAACCAATCATCTGTAGGAACACCAAACATAAACTAAAAACAAAAG	1733
<i>S. ph</i>	TTTCTCTATGAATGAAACCAATCATCTGTAGGAACACCAAACATAAACTAAAAACAAAAG	1727
GI04.1	TTTCTCTATGAATGAAACCAATCATCTGTAGGAACACCAAACATAAACTAAAAACAAAAG *****	1725
GI04.7	GTTTGCAGCTTTACATATTATTTAAACATATGAAATACAAGGTTTAAAGCTAAAGCCTGTA	1797
GI04.2	GTTTGCAGCTTTACATATTATTTAAACATATGAAATACAAGGTTTAAAGCTAAAGCCTGTA	1783
GI04.6	GTTTGCAGCTTTACATATTATTTAAACATATGAAATACAAGGTTTAAAGCTAAAGCCTGTA	1793
<i>S. ph</i>	GTTTGCAGCTTTACATATTATTTAAACATATGAAATACAAGGTTTAAAGCTAAAGCCTGTA	1787
GI04.1	GTTTGCAGCTTTACATATTATTTAAACATATGAAATACAAGGTTTAAAGCTAAAGCCTGTA	1785

GI04.7 GCTACAATGGTGGCTCCG 1815
GI04.2 GCTACAATGGTGGCTCCG 1801
GI04.6 GCTACAATGGTGGCTCCG 1811
S. ph GCTACAATGGTGGCTCCG 1805
GI04.1 GCTACAATGGTGGCTCCG 1803

***StGI.04* promóter proximális**

GI04.6 TAGCTACAATGGTGGCTCCGCATCTATATTAGGAACCCCTAGTGTAGATAATCCATAAT 60
GI04.2 TAGCTACAATGGTGGCTCCGCATCTATATTAGGAACCCCTAGTGTAGATAATCCATAAT 60
GI04.9 TAGCTACAATGGTGGCTCCGCATCTATATTAGGAACCCCTAGTGTAGATAATCCATAAT 60
GI04.11 TAGCTACAATGGTGGCTCCGCATCTATATTAGGAACCCCTAGTGTAGATAATCCATAAT 60
S. ph TAGCTACAATGGTGGCTCCGCATCTATATTAGGAACCCCTAGTGTAGATAATCCATAAT 60

GI04.6 TATGGAGTATTGAAATAATACGGACCCAAGCAAAATATATTTATGATATTGAGGATTCAT 120
GI04.2 TATGGAGTATTGAAATAATACGGACCCAAGCAAAATATATTTATGATATTGAGGATTCAT 120
GI04.9 TATGGAGTATTGAAATAATACGGACCCAAGCAAAATATATTTATGATATTGAGGATTCAT 120
GI04.11 TATGGAGTATTGAAATAATACGGACCCAAGCAAAATATATTTATGATATTGAGGATTCAT 120
S. ph TATGGAGTATTGAAATAATACGGACCCAAGCAAAATATATTTATGATATTGAGGATTCAT 120

GI04.6 ACATCCAACCCAAGTGTGGAAATTGAGGCGTAGTTGTTGTATAAATCTTTGTTGAGCT 180
GI04.2 ACATCCAACCCAAGTGTGGAAATTGAGGCGTAGTTGTTGTATAAATCTTTGTTGAGCT 180
GI04.9 ACATCCAACCCAAGTGTGGAAATTGAGGCGTAGTTGTTGTATAAATCTTTGTTGAGCT 180
GI04.11 ACATCCAACCCAAGTGTGGAAATTGAGGCGTAGTTGTTGTATAAATCTTTGTTGAGCT 180
S. ph ACATCCAACCCAAGTGTGGAAATTGAGGCGTAGTTGTTGTATAAATCTTTGTTGAGCT 180

GI04.6 TGAAAATCAATTTTCCTTGTAGTCATATGATTTTTGTTTGTGCCAATTTAATGGGCTGTT 240
GI04.2 TGAAAATCAATTTTCCTTGTAGTCATATGATTTTTGTTTGTGCCAATTTAATGGGCTGTT 240
GI04.9 TGAAAATCAATTTTCCTTGTAGTCATATGATTTTTGTTTGTGCCAATTTAATGGGCTGTT 240
GI04.11 TGAAAATCAATTTTCCTTGTAGTCATATGATTTTTGTTTGTGCCAATTTAATGGGCTGTT 240
S. ph TGAAAATCAATTTTCCTTGTAGTCATATGATTTTTGTTTGTGCCAATTTAATGGGCTGTT 240

GI04.6 AAGTGAATTACCATATTTCCCCTATTTTGCAGTTTCATCATCACTTCTCTCTGATGTTTT 300
GI04.2 AAGTGAATTACCATATTTCCCCTATTTTGCAGTTTCATCATCACTTCTCTCTGATGTTTT 300
GI04.9 AAGTGAATTACCATATTTCCCCTATTTTGCAGTTTCATCATCACTTCTCTCTGATGTTTT 300
GI04.11 AAGTGAATTACCATATTTCCCCTATTTTGCAGTTTCATCATCACTTCTCTCTGATGTTTT 300
S. ph AAGTGAATTACCATATTTCCCCTATTTTGCAGTTTCATCATCACTTCTCTCTGATGTTTT 300

***** *****

GI04.6 AATTTTCATAGAGTTTTGGTTTTATATTTTCGCTGTGTCAGCAAGGATGCCGTCATTGAAT 360
GI04.2 AATTTTCATAGAGTTTTGGTTTTATATTTTCGCTGTGTCAGCAAGGATGCCGTCATTGAAT 360
GI04.9 AATTTTCATAGAGTTTTGGTTTTATATTTTCGCTGTGTCAGCAAGGATGCCGTCATTGAAT 360
GI04.11 AATTTTCATAGAGTTTTGGTTTTATATTTTCGCTGTGTCAGCAAGGATGCCGTCATTGAAT 360
S. ph AATTTTCATAGAGTTTTGGTTTTATATTTTCGCTGTGTCAGCAAGGATGCCGTCATTGAAT 360

***** *****

GI04.6 GAAAACTTGATATATGAAACAGCGTGTTCCTCTAGATTTCCATGGAAATCCTCCA 420
GI04.2 GAAAACTTGATATATGAAACAGCGTGTTCCTCTAGATTTCCATGGAAATCCTCCA 420
GI04.9 GAAAACTTGATATATGAAACAGCGTGTTCCTCTAGATTTCCATGGAAATCCTCCA 420
GI04.11 GAAAACTTGATATATGAAACAGCGTGTTCCTCTAGATTTCCATGGAAATCCTCCA 420
S. ph GAAAACTTGATATATGAAACAGCGTGTTCCTCTAGATTTCCATGGAAATCCTCCA 420

GI04.6 ATACTTCTTTCACACAACCTTTTGGTGCTTGGTTTGTATCAAACCTAATTAACCTTCTTTTT 480
GI04.2 ATACTTCTTTCACACAACCTTTTGGTGCTTGGTTTGTATCAAACCTAATTAACCTTCTTTTT 480
GI04.9 ATACTTCTTTCACACAACCTTTTGGTGCTTGGTTTGTATCAAACCTAATTAACCTTCTTTTT 480
GI04.11 ATACTTCTTTCACACAACCTTTTGGTGCTTGGTTTGTATCAAACCTAATTAACCTTCTTTTT 480
S. ph ATACTTCTTTCACACAACCTTTTGGTGCTTGGTTTGTATCAAACCTAATTAACCTTCTTTTT 480

GI04.6 TATCTCTGGAGGATGCTTATTTCTTTATGCATCTGTCTAATAGTTTTGACTATCATTTGT 540

GI04.2	TATCTCTGGAGGATGCTTATTTCTTTATGCATCTGTCTAATAGTTTTGACTATCATTGT	540
GI04.9	TATCTCTGGAGGATGCTTATTTCTTTATGCATCTGTCTAATAGTTTTGACTATCATTGT	540
GI04.11	TATCTCTGGAGGATGCTTATTTCTTTATGCATCTGTCTAATAGTTTTGACTATCATTGT	540
<i>S. ph</i>	TATCTCTGGAGGATGCTTATTTCTTTATGCATCTGTCTAATAGTTTTGACTATCATTGT	540

GI04.6	GTTTTCTGTTTTGCAGGACAAATAGTCATATGTTGTAGTTAGTATCTGCTTACTATTTA	600
GI04.2	GTTTTCTGTTTTGCAGGACAAATAGTCATATGTTGTAGTTAGTATCTGCTTACTATTTA	600
GI04.9	GTTTTCTGTTTTGCAGGACAAATAGTCATATGTTGTAGTTAGTATCTGCTTACTATTTA	600
GI04.11	GTTTTCTGTTTTGCAGGACAAATAGTCATATGTTGTAGTTAGTATCTGCTTACTATTTA	600
<i>S. ph</i>	GTTTTCTGTTTTGCAGGACAAATAGTCATATGTTGTAGTTAGTATCTGCTTACTATTTA	600

GI04.6	ATCAGGGAATTTACATTCCCCTAACCTGCATATTATTTT-CAGAGATACCTTTGAAAGCTC	660
GI04.2	ATCAGGGAATTTACATTCCCCTAACCTGCATATTATTTT-CAGAGATACCTTT-GAA-GCTC	657
GI04.9	ATCAGGGAATTTACATTCCCCTAACCTGCATATTATTTT-CAGAGATACCTTT-GAA-GCTC	657
GI04.11	ATCAGGGAATTTACATTCCCCTAACCTGCATATTATTTT-CAGAGATACCTTT-GAA-GCTC	657
<i>S. ph</i>	ATCAGGGAATTTACATTCCCCTAACCTGCATATTATTTT-CAGAGATACCTTT-GAA-GCTC	657
	***** ***** ** *	
GI04.6	TGAGGTGGTTTTGCTCGTTTAGAAGTTTCTGGACCATCCTTTGCTAGGATTCCTAGATGT	720
GI04.2	TGAGGTGGTTTTGCTCGT-TAGAAGTT--TGGACCATCCTTTGCTAGGATCCTA-GATGT	714
GI04.9	TGAGGTGGTTTTGCTCGT-TAGAAGTT-CTGGACCATCCTTTGCTAGGATCCTA-GATGT	714
GI04.11	TGAGGTGGTTTTGCTCGT---GAAGTT-CTGGACCATCCTTTGCTAGGATCCTA-GATGT	714
<i>S. ph</i>	TGAGGTGGTTTTGCTCGT-TAGAAGTT-CTGGACCATCCTTTGCTAGGATCCTA-GATGT	714
	***** ***** ***** *****	
GI04.6	TGGAATTTACAATCTGTGGATCCTAGATTGGAAGTGGTACTTTGATGGGCCTAATTTT	780
GI04.2	TG---AAATTACAATCTGTGGATCCTAGATTGGAAGTGGTACTT-GATGG-CCTAATTT-	770
GI04.9	TG---AAATTACAATCTGTGGATCCTAGATTGGAAGTGGTACTT-GATGG-CCTAATTT-	770
GI04.11	TG---AAATTACAATCTGTGGATCCTAGATTGGAAGTGGTACTT-GATGG-CCTAATTT-	770
<i>S. ph</i>	TG---AAATTACAATCTGTGGATCCTAGATTGGAAGTGGTACTT-GATGG-CCTAATTT-	770
	** ** * * * * * ***** ***** *****	
GI04.6	GTAGCATCCCTCTCATTATTGATTTAAAATTCTTGGGATTGATAGCAGTTTT	831
GI04.2	GTAGCATCC--CTCAT-ATTGAT-AAAATTCTTGG-ATTGATAGCAGTTAT	815
GI04.9	GTAGCATCC-TCTCAT-ATTGAT-AAAATTCTTGG-ATTGATAGCAGTTAT	815
GI04.11	GTAGCATCC-TCTCAT-ATTGAT-AAAATTCTTGG-ATTGATAGCAGTTAT	815
<i>S. ph</i>	GTAGCATCC-TCTCAT-ATTGAT-AAAATTCTTGG-ATTGATAGCAGTTAT	815
	***** ***** ***** ***** ***** *	

A *S. tuberosum* cv. 'Désirée'-ből klónozott és a SpudDB-ből kinyert *S. tuberosum* Phureja csoport *GI.04* promóter fragmensek szekvencia összehasonlítása. -2601 bp-tól -816 bp-ig és -816 bp-tól +65 bp-ig terjedő *GI.04* fragmenseket PCR-rel amplifikáltuk a 'Désirée' genomi DNS-éből az StGI.04 -2601 Fw és StGI.04 -816 R, valamint az StGI.04 -816 Fw és az StGI.04 +65 R primer párokkal. A primer szekvenciái 5. mellékletben találhatóak meg. A fragmentumokat a pGEM-T Easy vektorba klónoztuk és négy rekombináns klón DNS-ét szekvenáltattuk meg. A Clustal Omega program segítségével hasonlítottuk össze a szekvenciákat.

M9. *Gl.12* promóter szekvencia

StGl.12 promóter disztális

<i>S. ph</i>	TTAGACAGCTCCTCCCACTAATGCATTTTCTATTCAATT-----	39
GI12.2	TTAGACAGCTCCTCCCACTAATGCATTTTCTATTCAATTAT-----	41
GI12.9	TTAGACAGCTCCTCCCACTAATGCATTTTCTATTCAATTATTACCCAATTAATAAATTT	60
GI12.1	TTAGACAGCTCCTCCCACTAATGCATTTTCTATTCAATTAT-----	41
GI12.10	TTAGACAGCTCCTCCCACTAATGCATTTTCTATTCAATTATTACCCAATTAATAAATTT *****	60
<i>S. ph</i>	-----ATTCACCCAATTAATAAATTTTAAATTTCACTTCTT	75
GI12.2	-----ATTCACCCAATTAATAAATTTTAAATTTCACTTCTT	77
GI12.9	TTAATTTCACTTCTTCAAGTTTTTGTTCACCCAATTAATAAATTTTAAATTTCACTTCTT	120
GI12.1	-----ATTCACCCAATTAATAAATTTTAAATTTCACTTCTT	77
GI12.10	TTAATTTCACTTCTTCAAGTTTTTGTTCACCCAATTAATAAATTTTAAATTTCACTTCTT *****	120
<i>S. ph</i>	CAAGTTTTTGTCTACTATTATATCTTAATTTAAGTTGCTAGAGTACCTATTTTATTTTT	135
GI12.2	CAAGTTTTTGTCTACTATTATATCTTAATTTAAGTTGCTAGAGTACCTATTTTATTTTT	137
GI12.9	CAAGTTTTTGTCTACTATTATATCTTAATTTAAGTTGCTAGAGTACCTATTTTATTTTT	180
GI12.1	CAAGTTTTTGTCTACTATTATATCTTAATTTAAGTTGCTAGAGTACCTATTTTATTTTT	137
GI12.10	CAAGTTTTTGTCTACTATTATATCTTAATTTAAGTTGCTAGAGTACCTATTTTATTTTT *****	180
<i>S. ph</i>	ATATTTATTACAAGGAAGAAACATAGTTCATCTTCTTCTATTCTTTTGTAGAAGATAAAA	195
GI12.2	ATATTTATTATAAGGAAGAAACATAGTTCATCTTCTTCTATTCTTTTGTAGAAGATAAAA	197
GI12.9	ATATTTATTATAAGGAAGAAACATAGTTCATCTTCTTCTATTCTTTTGTAGAAGATAAAA	240
GI12.1	ATATTTATTATAAGGAAGAAACATAGTTCATCTTCTTCTATTCTTTTGTAGAAGATAAAA	197
GI12.10	ATATTTATTATAAGGAAGAAACATAGTTCATCTTCTTCTATTCTTTTGTAGAAGATAAAA *****	240
<i>S. ph</i>	ATTAGAAAATAAAATCTTATATTCTTGGTTT-ATTTATTTTTATAAATTATTAACAACA	254
GI12.2	ATTAGAAAATAAAATCTTATATTCTTGGTTT-ATTTATTTTTATAAATTATTAACAACA	256
GI12.9	ATTAGAAAATAAAATCTTATATTCTTGGTTTTATTTATTTTTATAAATTATTAACAACA	300
GI12.1	ATTAGAAAATAAAATCTTATATTCTTGGTTT-ATTTATTTTTATAAATTATTAACA-AT	255
GI12.10	ATTAGAAAATAAAATCTTATATTCTTGGTTTTATTTATTTTTATAAATTATTAACA-AT *****	299
<i>S. ph</i>	ATAATAACATATTTAATATAATGTCACAAGTGAGGTTAAGAGGGTAGAGTGACAAGATC	314
GI12.2	ATAATAACATATTTAATATAATGTCACAAGTGAGGTTAAGAGGGTAGAGTGACAAGATC	316
GI12.9	ATAATAACATATTTAATATAATGCCACAAGTGAGGTTAAGAGGGTAGAGTGACAAGATC	360
GI12.1	ATAATAACATATTTAATATAATGCCACAAGTGAGGTTAAGAGGGTAGAGTGACAAGATC	315
GI12.10	ATAATAACATATTTAATATAATGCCACAAGTGAGGTTAAGAGGGTAGGGTGACAAGATC *****	359
<i>S. ph</i>	TTACGTTTACCTTGTGAAGGTATAAAAAGGTATTATTGAAAGACGTTCAACTCAAGTGCAA	374
GI12.2	TTACGTTTACCTTGTGAAAGTATAAAAAGGTATTATTGAAAGACGTTCAACTCAAGTGCAA	376
GI12.9	TTACGTTTACCTTGTGAAGGTATAAAAAGGTATTATAGAAAGACCTTCAACTCAAGTGCAA	420
GI12.1	TTACGTTTACCTTGTGAAGGTATAAAAAGGTATTATTGAAAGACCTTCAACTCAAGTGCAA	375
GI12.10	TTACGTTTACCTTGTGAAGGTATAAAAAGGTATTATTGAAAGACCTTCAACTCAAGTGCAA *****	419
<i>S. ph</i>	CAAAACAAAGTATTCATGAAAAAGGAAATACAATAGTGAACAAAACATGTCAATTAATAA	434
GI12.2	CAAAACAAAGTATTCATGAAAAAGGAAATACAATAGTGAACAAAACATGTCAATTAATAA	436
GI12.9	CAAAACAAAGTATTTATGAAAAAGGAAATACAATAGTGAACAAAACATGTCAATTAATAA	480
GI12.1	CAAAACAAAATATTTATGAAAAAGGAAATACAATAGTGAACAAAACATGTCAATTAATAA	435
GI12.10	CAAAACAAAATATTTATGAAAAAGGAAATACAATAGTGAACAAAACATGTCAATTAATAA *****	479
<i>S. ph</i>	GAAAAGTAGTACAAACCATTTCAGGAAAAAAGAGAGAATAATAACAATAATGAAATAATGC	494
GI12.2	GAAAAGTAGTACAAACCATTTCAGGAAAAAAGAGAGAATAATAACAATAATGAAATAATGC	496
GI12.9	GAAAAGTAGTACGAACCATATAAGAAAAAAGAGAGAATAATAACAATAATGAAATAATGC	540
GI12.1	GAAAAGTAGTACAAACCATTCAAGAAA-AAAAAGAATAATAACAATAATGAAATAATGC	494
GI12.10	GAAAAGTAGTACAAACCATTCAAGAGA-AAAAAGAATAATAACAATAATGAAATAATGC *****	538
<i>S. ph</i>	GCTAACTGAAACACATTAGACAACAAATGGTATCAGATATCAAAGCAAGAAATTACATA	554
GI12.2	GCTAACTGAAACACATTAGACAACAAATGGTATCAGATATCAAAGCAAGAAATTACATA	556
GI12.9	GTTAACGGAACACATTAGACAACAAATGGTATCAGATATCAAAGCAAGAAATTACATA	600

GI12.1	GCTAACTGTAACACATTAGACAACAAATGGTATCAGATATCAAAGCAAGAAATTACACA	554
GI12.10	GCTAACTGTAACACATTAGACAACAAATGGTATCAGATATCAAAGCAAGAAATTACACA * **** * ****	598
<i>S. ph</i>	TATAAGGCTAATATTACGAGAACACGGTGCTCCCAAACCTCCACTAAGTCTAATCCCGCT	614
GI12.2	TATAAGGCTAATATTACGAGAACATGGTGCTCCCAAACCTCCACTAAGTCTAATCCCGCT	616
GI12.9	TATAAGGCTAATATTACGAGAACACGGTGCTCCCAAACCTCCACTAAGTCTAATCCCGCT	660
GI12.1	TATAAGGCTAATATTACGAGAACACGGTGCTCCCAAACCTCCACTAAGTCTAATCCCGCT	614
GI12.10	TATAAGGCTAATATTACGAGAACACGGTGCTCCCAAACCTCCACTAAGTCTAATCCCGCT *****	658
<i>S. ph</i>	GAAAAGTGAGTCAAACCTCAATTACCTACTAACATTTCTACCTTATTCTGCAATCTCCACA	674
GI12.2	GAAAAGTGAGTCAAACCTCAATTACCTACTAACATTTCTACCTTATTCTGCAATCTCCACA	676
GI12.9	GAAAAGTGAGTCAAACCTCAATTACCTACTAACATTTCTACCTTATTCTGCAATCTCCACA	720
GI12.1	GAAAAGTGAGTCAAACCTCAATTACCTACTAACATTTCTACCTTATTCTGCAATCTCCACA	674
GI12.10	GAAAAGTGAGTCAAACCTCAATTACCTACTAACATTTCTACCTTATTCTGCAATCTCCACA *****	718
<i>S. ph</i>	CCCTCCTATCTAATATCATGTCTTCAATCGGGAAGTTGAAGTTGTACCATGTCCCTGTCTA	734
GI12.2	CCCTCCTATCTAATATCATGTCTTCAATCGGGAAGTTGAAGTTGTACCATGTCCCTGTCTA	736
GI12.9	CCCTTCTATCTAACATCATGTCTTCAATCGGGAAGTTGAAGTTGTACCATGTCCCTGTCTA	780
GI12.1	CTCTCCTATCTAATATCATGTCTTAAATCGGGAAGATGAAGTTGTACCATGTCCCTGTCTA	734
GI12.10	CTCTCCTATCTAATATCATGTCTTAAATCGGGAAGATGAAGTTGTACCATGTCCCTGTCTA * ** *****	778
<i>S. ph</i>	ATTACCTCTCTTCAATACTTCTTAAAGTTTATCTTTCACATTTTTCGCATACCATCATATTCA	794
GI12.2	ATTACCTCTCTTCAATACTTCTTAAAGTTTATCTTTCACATTTTTCGCATACCATCATATTCA	796
GI12.9	ATTACCTCTCTCCAATACTTCTTAAAGTTTATCTTTCACATTTTTCGCATACCATCATATTCA	840
GI12.1	ATTACCTCTCTCCAATACTTCTTAAAGTTTATCTTTCACATTTTTCGCATACCATCATATTCA	794
GI12.10	ATTACCTCTCTCCAATACTTCTTAAAGTTTATCTTTCACATTTTTCGCATACCATCATATTCA *****	838
<i>S. ph</i>	ACCTCTCACACCTCCTCACTAGGCATCTT-----CATACGTCCAATTC	837
GI12.2	ACCTCTCACACCTCCTCACTAGGCATCTT-----CATACGTCCAATTC	839
GI12.9	ACCTCTCACACCTCCTCACTAGGCATCTTTCATACACATTTCCCTCTTCATACGTCCAATTC	900
GI12.1	ACCTCTCACACCTCCTCACTAGGCATCTTTCATACACATTTCCCTCTTCATACGTCCAATTC	854
GI12.10	ACCTCTCACACCTCCTCACTAGGCATCTTTCATACACATTTCCCTCTTCATACGTCCAATTC *****	898
<i>S. ph</i>	ATCTTAATCCCGCTTCTCTCATTTTATCCACCACAAAGACTATTACATTTTATCCAAAA	897
GI12.2	ATCTTAATCCCGCTTCTCTCATTTTATCCACCACAAAGACTATTACATTTTATCCAAAA	899
GI12.9	ATCTTAATCCCGCTTCTCTCATTTTATCCACCACAAAGACTATTACATTTTATCCAAAA	960
GI12.1	ATCTTAATCCCGCTTCTCTCATTTTATCCACCACAAAGACTATTACATTTTATCCAAAA	914
GI12.10	ATCTTAATCCCGCTTCTCTCATTTTATCCACCACAAAGACTATTACATTTTATCCAAAA *****	958
<i>S. ph</i>	AATTCTTTTT-TTAAATCTT-ATCTCACTTAGTATGCAAACACATTAATAAGTTCTCAAA	955
GI12.2	AAATCTTATTTTAAATCTTATCTCACTTTAGTATGCAACACATTAATAAGTTCTCAAA	959
GI12.9	AATTCTTATTCT--TAATCTTATCTCACTTAGTATGCAAACACATTAATAAGTTCTCAAA	1018
GI12.1	AATTCTTATTCT--TAATCTTATCTCACTTAGTATGCAAACACATTAATAAGTTCTCAAG	972
GI12.10	AATTCTTATTCT--TAATCTTATCTCACTTAGTATGCAAACACATTAATAAGTTCTCAAG ** * * * * * *****	1016
<i>S. ph</i>	CAATTGCAAAATCAATGTTATGAATACTACAATTATGGGTGTGTTAAGATTGTTTTTTTA	1015
GI12.2	CAATTGCAAAATCAATGTTATGAATACTACAATTATGGGTGTGTTAAGATTGTTTTTTT	1019
GI12.9	CAATTGCAAAATCAATGTTATGAATACTACAATAATTATGGGTGTGTTAAGATTGCTTTTTT	1078
GI12.1	CAATTGCAAAATCAATGTTATGAATACTACAGTTATGGGTGTGTTGAGATTGTTTTTTTA	1032
GI12.10	CAATTGCAAAATCAATGTTATGAATACTACAATTATGGGTGTGTTGAGATTGTTTTTTTA *****	1076
<i>S. ph</i>	AAAATAGCTTATAAGCTAAATGTCATAAAAGTCTATTTGGATTGACTTTTTATTTTTAAT	1075
GI12.2	AAAATAGCTTATAAGCTAAATGTCATAAAAGTCTATTTGGATTGACTTTTTATTTTTAAT	1079
GI12.9	TAAATAGCTTATAACCTAAATGT-ATAAAAGTCTATTTGGATTGACTTTTTATTTTTAAT	1137
GI12.1	AAAATAGCTTATAAGCTAGATGTCATAAAAGTCTATTTGGATTGACTTTTTATTTTTAAT	1092
GI12.10	AAAATAGCTTATAAGCTAGATGTCATAAAAGTCTATTTGGATTGACTTTTTATTTTTAAT *****	1136
<i>S. ph</i>	TATTTTTTACTTATTTTTAACATTTTAGTTTTAAACTAAAGTGTTTAGCATTGACTTTA	1135
GI12.2	TATTTTTTACTTATTTTTAACATTTTAGTTTTAAACTAAAGTGTTTAGCATTGACTTTA	1139
GI12.9	TGTTTTTTACTTATTTTTAACATTTTAGTTTTAAACTAAAGTGTTTAGTATTTGACTTTA	1197

GI12.1	TATTTTTTACTTATTTTTAACATTTTAGTTTAAACTAAAGTGTTTAGCATTTTGGACTTA	1152
GI12.10	TATTTTTTACTTATTTTTAACATTTTAGTTTAAACTAAAGTGTTTAGCATTTTGGACTTA * *****	1196
<i>S. ph</i>	TTTTTACCATTCCACTTTTCTTTTTTCAGCTAACTAGCAATGTGAGACTTTATTCCACATCT	1195
GI12.2	TTTTTACCATTCTACTTTTCTTTTTTCAGCTAACTAGCAATGTGAGACTTTATTCCACATCT	1199
GI12.9	TTTTTACCATTCTACTTTTCTTTTTTCAGCCAACCTAGCAATGTGAGACTTTATTCCACATCT	1257
GI12.1	TTTTTACCATTCTACTTTTCTTTTTTCAGCTAACTAGCAATGTGAGACTTTATTCCACATCT	1212
GI12.10	TTTTTACCATTCTACTTTTCTTTTTTCAGCTAACTAGCAATGTGAGACTTTATTCCACATCT *****	1256
<i>S. ph</i>	CCAACATCT-----CTCTATAAATTTCCATCAAGAAATACTAATTAGTTG	1241
GI12.2	CCAACATCT-----CTCTATAAATTTCCATCAAGAAATACTAATTAGTTG	1245
GI12.9	CCAACATCACAGTCTCTTTCTCTCTCTCTATAAATTTCCATCAAGAAATACTAATTAGTTG	1317
GI12.1	CCAACATCACAGTCTCTTTCTCTCTCTCTATAAATTTCCATCAAGAAATACTAATTAGTTG	1272
GI12.10	CCAACATCACAGTCTCTTTCTCTCTCTCTATAAATTTCCATCAAGAAATACTAATTAGTTG *****	1316
<i>S. ph</i>	GATTAAATGAAGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGG	1273
GI12.2	GATTAAATGAAGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGG	1277
GI12.9	GATTAAATGAAGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGG	1349
GI12.1	GATTAAATGAAGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGG	1304
GI12.10	GATTAAATGAAGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGG *****	1348

***StGI.12* promóter proximális**

<i>S. ph</i>	AGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGGAACATGTTATTCCAGGATAAGTTATTACGAAAGGCCTA	60
GI12.4	AGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGGAACATGTTATTCCAGGATAAGTTATTACGAAAGGCCTA	60
GI12.12	AGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGGAACATGTTATTCCAGGATAAGTTATTACGAAAGGCCTA	60
GI12.2	AGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGGAACATGTTATTCCAGGATAAGTTATTACGAAAGGCCTA	60
GI12.10	AGTAAGAAGTCGTTTCGATTGGGAACATGTTATTCCGGGATAAGTTACTACGAATGGCCTA *****	60
<i>S. ph</i>	ACCCATCGGTGGCCCCCTAAAGTTGACACCATATTTTACTTAGACACTTCAATGGAGCGA	120
GI12.4	ACCCATCGGTGGCCCCCTAAAGTTGACACCATATTTTACTTAGACACTTCAATGGAGCGA	120
GI12.12	ATCCATCGGTGACCCCTAAAGTTGACATCATATTTTACTTAGACACTTCAACGGAGCGA	120
GI12.2	ATCCATCGGTGACCCCTAAAGTTGACATCATATTTTACTTAGACACTTCAACGGAGCGA	120
GI12.10	ACCCATTGGTGACCCCTAAAGTTGACACCATATTTTACTTAGACACTTCAACGGAGCGA * ****	120
<i>S. ph</i>	TATTCATTTTAGACACCTCATGTAGGATTTTCGCTGTGTCATTTTGATTATGTATATGAAA	180
GI12.4	TATTCATTTTAGACACCTCATGTAGGATTTTCGCTGTGTCATTTTGATTATGTATATGAAA	180
GI12.12	TGTTTCATTTTAGACACCTCATGTAGGGTCTCGTTGTGTCATTTTGATTATGTATATGAAA	180
GI12.2	TGTTTCATTTTAGACACCTCATGTAGGGTCTCGTTGTGTCATTTTGATTATATATATGAAA	180
GI12.10	TGTTTCATTTTAGACACCTCATGTAGGATCTCGTTGTGTCATTTTCGATTATATATATGAAA * *****	180
<i>S. ph</i>	TATTTTATCCATCACTAATATATAAATGATGAGAAAAATAGTTCAGAACCAACCTAAT	240
GI12.4	TATTTTATCCATCACTAATATATAAATGATGAGAAAAATAGTTCAGAACCAACCTAAT	240
GI12.12	TAATTTATCCCATTA--ATATAAATGATGAGATAAA--TAATCTCAGAACCAACCTAAT	237
GI12.2	TAATTTATCCCATCACTAATATATAAATGATGAGATAAA--TAATCCCAAAACCAACCTAAT	239
GI12.10	TAATTTATCCCATCACTAATATATAAATGATGAGATAAA--TAATCCCAAAACCAACCTAAT ** *****	239
<i>S. ph</i>	ACCTCCGACTAAATACAAGATAAAAATAGTCATACATTTTATCCCTAAGATTATTATGCCG	300
GI12.4	ACCTCCGACTAAATACAAGATAAAAATAGTCATACATTTTATCCCTAAGATTATTATGCCG	300
GI12.12	ACCTCCAACATAACACAAGATAAAAATAGTCATTCATTTTATCTCTAAGATTATTATGCCA	297
GI12.2	ACCTCCGACTAAACACAAGATAAAAATAGTTATATATTTTATCCCTAAAATATTATGCCG	299
GI12.10	ACCTCCGACTAAACACAAGATAAAAATAGTTATATATTTTATCCCTAAAATATTATGCCG *****	299
<i>S. ph</i>	TATATCTCACACCGTAAATGAGAAAGTAGGTATGTATGTGATGATGAAGCAATTAGTCCA	360
GI12.4	TATATCTCACACCGTAAATGAGAAAGTAGGTATGTATGTGATGATGAAGCAATTAGTCCA	360
GI12.12	CATATCTCACACCATAAGTGAGAAAGTAGGTATGTATGTGATGATGAAGCAATTAGTCCA	357
GI12.2	TATATCTCACACCGTAAATGAGAAAGTAGGTATGTATGTGATGATGAAGCAATTAGTCCA	359
GI12.10	TATATCTCACACCGTAAATGAGAAAGTAGGTATGTATGTGATGATGAAGCAATTAGTCCA *****	359
<i>S. ph</i>	CTTGCTTGCCACATGGCCCTCTTAAGATCTGAGGAAAATATCATCGCCACGTATGCATTG	420
GI12.4	CTTGCTTGCCACATGGCCCTCTTAAGACCTGAGGAAAATATCATCGCCACGTATGCATTG	420

GI12.12	CTTGCTTGCCACATGGCCCTCTTAAGGTCTGAGGAAAAATATCATCGCCACGTATGCATTA	417
GI12.2	CTTGCTTGCCACATGGCCCTCTTAAGATCTGAGGAAAAATATCATCGCCACGTATGCATTA	419
GI12.10	CTTGCTTGCCACATGGCCCTCTTAAGATCTGAGGAAAAATATCATCGCCACGTATGCATTA	419

<i>S. ph</i>	AGAAAACACAGCTAAAGATCTTCTTTCTGCTCCATATCTTTTTCTTCTTTAAACTCTT	480
GI12.4	AGAAAACACAGCTAAAGATCTTCTTTCTGCTCCATATCTTTTTCTTCTTTAAACTCTT	480
GI12.12	AGAAAACACAGTTAAAGATCTTCTTTCTGCTCCATATCTTTTTCTTCTTTAAACTCTT	477
GI12.2	AGAAAACACAGTTAAAGATCTTCTTTCTGCTCCATATCTTTTTCTTCTTTAAACTCTT	479
GI12.10	AGAAAACACAGTTAAAGATCTTCTTTCTGCTCCATATCTTTTTCTTCTTTAAACTCTT	479

<i>S. ph</i>	CTTCTCCTCCTTGATTTTTTTCTCTCAAATCCCTAAAATATCTTCCCTAAAATCCTTC	540
GI12.4	CTTCTCCTCCTTGATTTTTTTCTCTCAAATCCCTAAAATATCTTCCCTAAAATCCTTC	540
GI12.12	CTTCTCCTCCTTGATTTTTTTCTCTCAAATCCCTAAAATATCTTCCCTAAAATCCTTT	537
GI12.2	CTTCTCCTCCTTGATTTTTTTCTCTCAAATCCCTAAAATATCTTCCCTAGAATCTTT	539
GI12.10	CTTCTCCTCCTTGATTTTTTTCTCTCAAATCCCTAAAATATCTTCCCTAAAATCCTTT	539

<i>S. ph</i>	TT-TTTTTCCAGATTTACCCTCACCAGTTTTTCAGAATTCACATCTACGGTAGTTACCA	599
GI12.4	TT-TTTTTCCAGATTTACCCTCACCAGTTTTTCAGAATTCACATCTACGGTAGTTACCA	599
GI12.12	TTTTTTCTTCCAGATTTACCCTCACCAGTTTTTCAGAATTCACATCTACGGTAGTTACCA	597
GI12.2	TTTTTTCTTCCAGATTTACCCTCACCAGTTTTTCAGAATTCACATCTACGGTAGTTACCA	599
GI12.10	TTTTTTCTTCCAGATTTACCCTCACCAGTTTTTCAGAATTCACATCTACGGTAGTTACCA	599
	** **	
<i>S. ph</i>	TTTTTTTTATTA-----AAATAAACTTTGTTCTAATAATTTTTTTCTGGGTTTCTTC	651
GI12.4	TTTTTTTTATTA-----AAATAAACTTTGTTCTAATAATTTTTTTCTGGGTTTCTTC	651
GI12.12	TTTTTTTTATTTTTTTTATTAATAAACTTTGTTCT-AATAATTTTTTTCTGGGTTTCTTC	656
GI12.2	TTTTTTTTATTTTTTTTATTAATAAACTTTGCTCT-AATAATTTTTTTCTGGGTTTCTTC	658
GI12.10	TTTTTTTTATTTTTTTTATTAATAAACTTTGCTCT-AATAATTTTTTTCTGGGTTTCTTC	658

<i>S. ph</i>	GTGCATAATATGTTATAGATGTTGAGCTGTATTTGTTTTGAA--GGTTTTTAAAAAAA	709
GI12.4	GTGCATAATATGTTATAGATGTTGAGCTGTATTTGTTTTGAA--GGTTTTTAAAAAAA	709
GI12.12	GTGCATAATATGTTGAGGTGTTGAGCTGTTTTGTTTTGAAAGGTTTTTTTTAAAAA	716
GI12.2	GTGCATAATATGTTGAGATGTTGAACTGTTTTGTTTTGAAAGGTTTTTTTTAAAAA-A	717
GI12.10	GTGCATAATATGTTGAGATGTTGAACTGTTTTGTTTTGAAAGGTTTTTTTTAAAAA-A	717

<i>S. ph</i>	GTTGTCGAACAGTTTTATTGTACTATTTTCGATTTTCTTTTTTTAGGAATAAGAATTGAG	769
GI12.4	ATTGTCGAACAGTTTTATTGTACTATTTTCGATTTTCTTTTTTTAGGAATAAGAATTGAG	769
GI12.12	ATTTTCGAACAGTTTTATTGTACTATTTTCGAT-T-TTTTTTTAGGAATAAGAATTGAG	774
GI12.2	ATTGTCGAACAGTTTTATTGTACTATTTTCGAT-T-TTTTTTTAGGAATAAGAATTGAG	775
GI12.10	ATTGTCGAACAGTTTTATTGTACTATTTTCGATTT-TT-TTTTTTAGGAATAAGAATTGAG	775
	* * *****	
<i>S. ph</i>	AAACAGTATATAATTGGAGAATTGATTATACTTCTAATTTATTTGAAAATATTTT-TTTT	828
GI12.4	AAACAGTATATAATTGGAGAATTGATTATACTTCTAATTTATTTGAAAATAATTTTTTTT	829
GI12.12	AAACAGTATATAATCGGAGAATTGATTATACTTCTAATTTACTTGAGAATAATTTA-TTT	833
GI12.2	AAACAGTATATAATCGGAGAATTGATTATACTTCTAATTTACTTGAGAATAATTTA-TTT	834
GI12.10	AAACAGTATATAATCGGAGAATTGATTATACTTCTAATTTACTTGAGAATAATTTA-TTT	834

<i>S. ph</i>	TTTTTTGACAATTTGTGCAAGTGATAATTTTCTGTTAATGGGAAAATGAAAAAAAAGAAG	888
GI12.4	TTTTTTGACAATTTGTGCAAGTGATAATTTTCTGTTAATGGGAAAATGAAAAAAAAGAAG	889
GI12.12	ATTTTTGACAATTTGTGCAAGTGATAGTTTCTGTTAATGGGAAAATGAAAAAAA-AAAG	892
GI12.2	ATTTTTGACAATTTGTGCAAGTGATAGTTTCTGTTAATGGGAAAATGAAAAAAAAGAAG	894
GI12.10	ATTTTTGACAATTTGTGCAAGTGATAGTTTCTGTTAATGGGAAAATGAAAAAAA-AAAG	893

<i>S. ph</i>	AAGTTTTTTGTT-----CCGTTTATTTTCAGATCATTGTTGATGAATTAATACTTTT	939
GI12.4	AAGTTTTTTGTT-----CCGTTTATTTTCAGATCATTGTTGATGAATTAATACTTTT	940
GI12.12	TTTTTTGTTCCCTTTATTTTTTAGGAGAAAAAAGGGTTCATTTTGTGATGAATTAATACTTTT	952
GI12.2	TTTTTTGTTCCCTTTATTTTTTAGGAGAAAAAAGGGTTCATTTTGTGATGAATTAATACTTTT	954
GI12.10	TTTTTTGTTCCCTTTATTTTTTAGGAGAAAAAAGGGTTCATTTTGTGATGAATTAATACTTTT	953
	** * * * *	
<i>S. ph</i>	TTTTAAGCTTTCAAAGGTATTAATTTAGTTGTGCATTTGTGTAACAGTTTGAAGTTTTT	999
GI12.4	TTTTAAGCTTTCAAAGGTATTAATTTAGTTGTGCGTTTGTGCAACAGTTTGAAGTTTTT	1000
GI12.12	TTTTAAGCGTCAAAGGTATTAATTTAGTTGTGCATTTGTGTAACAGTTTGAAGTTTTT	1012

GI12.2	TTTTAAGCTGTCAAAGGTATTAATTTAGTTGTGCATTTGTGTAACAGTTTGAAGATTTT	1014
GI12.10	TTTTAAGCTGTCAAAGGTATTAATTTAGTTGTGCATTTGTGTAACAGTTTGAAGATTTT	1013
	**** * *****	
<i>S. ph</i>	TTG--TTTTTTTTTGTGATGGTTTGTGCAAGTGAATGAACTGCAAACGCTTTTTTCCTGT	1057
GI12.4	TTG--TTTTTTTTTGTGATGGTTTGTGCAAGTGAATGAACTGCAAACGCTTTTTTCCTGT	1058
GI12.12	TTCT--TTTTTCTTGTGATGATTTGTGCAAGTGAATGAACTGCAAACACTTTTTTCCTGT	1071
GI12.2	TTTTTTTTTTTTTGTGATGATTTGTGCAAGTGAATGAACTGCAAACACTTTTTTCCTGT	1074
GI12.10	TTTT--TTTTTTTTTGTGATGATTTGTGCAAGTGAATGAACTGCAAACACTTTTTTCCTGT	1072
	** *****	
<i>S. ph</i>	TAATGGGAAAAAATGGGAAAAAATTGTTTCATTTTTTAGGAGAAAAAGGGTTCCTTTT	1117
GI12.4	TAATGGGAAAAAATGGGAAAAAATTGTTTCATTTTTTAGGAGAAAAAGGGTTCCTTTT	1118
GI12.12	TAATGGGAAAAAATGGGA-AAAAAATTGTTCCCTTTTTTAGGAGAAAAAGGGTTCCTTTT	1130
GI12.2	TAATGGGAAAAAATGGGA-AAAAAATTGCTCCCTTTTTTAGGAGAAAAAGGGTTCCTTTT	1133
GI12.10	TAATGGGAAAAAATGGGA-AAAAAATTGTTCCCTTTTTTAGGAGAAAAAGGGTTCCTTTT	1131
	***** ** *****	
<i>S. ph</i>	GCTTTCAAAAGGTATTAATTTTGTGTGCATTTGTTAACTGTTTGTGATGATTTTTTATTT	1177
GI12.4	GCTTTCAAAAGGTATTAATTTTGTGTGCATTTGTTAACTGTTTGTGATGATTTTTTATTT	1178
GI12.12	GCTTTCAAAAGGTATTAATTTTGTGTGCGTTTGTAACTGTTTGTGATGATTTTTTATCT	1190
GI12.2	GCTTTCAAAAGGTATTAATTTTGTGTGCATTTGTTAACTGTTTGTGATGATTTTTTATTT	1193
GI12.10	GCTTTCAAAAGGTATTAATTTTGTGTGCATTTGTTAACTGTTTGTGATGATTTTTTATTT	1191
	***** *	
<i>S. ph</i>	TTTGGTTTTGCAGGATAAAGTGGTGTATTATTATGTCTTCTTCACTGTTTAAATAGTGAA	1237
GI12.4	TTTGGTTTTGCAGGATAAAGTGGTGTATTATTATGTCTTCTTCACTGTTTAAATAGTGAA	1238
GI12.12	TTTGGTTTTGCAGGATAAAGTGGTGTATTATTATGTCTTCTTCACTGTTTAAATAGTGAA	1250
GI12.2	TTTGGTTTTGCAGGATAAAGTGGTGTATTATTATGTCTTCTTCACTGTTTAAATAGTGAA	1253
GI12.10	TTTGGTTTTGCAGGATAAAGTGGTGTATTATTATGTCTTCTTCACTGTTTAAATAGTGAA	1251

<i>S. ph</i>	ATCTACAACCTGCCATAAGCTGGTTATAACATTAAGGGAGTAGCTTGAAGCTCTAAGGTA	1297
GI12.4	ATCTACAACCTGCCATAAGCTGGTTATAACATTAAGGGAGTAGCTTGAAGCTCTAAGGTA	1298
GI12.12	ATCTACAACCTGCCATAAGCTGGTTATAACATTAAGGGACTAGCTTGAAGCTCTAAGGTA	1310
GI12.2	ATCTACAACCTGCCATAAGCTGGTTATAACATTAAGGGACTAGCTTGAAGCTCTAAGGTA	1313
GI12.10	ATCTACAACCTGCCATAAGCTGGTTATAACATTAAGGGACTAGCTTGAAGCTCTAAGGTA	1311

<i>S. ph</i>	ATTTTCTTGATAAGATCCCTGGATCCCGTGGCA-----ATTTTCATTAAGGAGGT	1348
GI12.4	ATTTTCTTGATAAGATCCCTGGATCCCGTGGCGGAGCCAG-ATTTTCATTAAGGAGGT	1358
GI12.12	ATTTTCTTGATAAGATACCTGGACCCCGTGGCGGAGCCCG-ATTTTCATTAAGGAGGT	1369
GI12.2	ATTTTCTTGATAAGATACCTGGACCCCGTGGCGGAGCCAG-ATTTTCATTAAGGAGGT	1372
GI12.10	ATTTTCTTGATAAGATACCTGGACCCCGTGGCGGAGCCAG-ATTTTCATTAAGGAGGT	1370
	***** *****	
<i>S. ph</i>	TCAAAATATGAAGTAAACATATGAAAAAGTTAGGGGTTCAACACTTACCATATATACGT	1408
GI12.4	TCAAAATATGAAGTAAACATATGAAAAAGTTAGGGGTTCAACACTTACCATATATACGT	1418
GI12.12	TCGAAATATGAAGTAAACATATGAAAAAGTCTAGGGGTTCAACATTTACCATATATACGT	1429
GI12.2	TCGAAATATGAAGTAAACATATGAAAAAGTCTAGGGGTTCAACATTTACCATATATACGT	1432
GI12.10	TCGAAATATGAAGTAAACATATGAAAAAGTCTAGGGGTTCAACATTTACCATATATACGT	1430
	** *****	
<i>S. ph</i>	AAAAAAAAAAAAAACCCTGTATAAACTGTATAATTATGAACCCCATTAACCTTACTAGTT	1468
GI12.4	AAAAAA-AAAAAACCCTGTATAAACTGTATAATTATGAACCCCATTAACCTTACTAGTT	1477
GI12.12	AAA-----AAAAAACCCTGTATAAACTGTATAATTATGAACCCCATTAACCTTACTAGTT	1484
GI12.2	AAA-----AAAAAACCCTGTATAAACTGTATAATTATGAACCCCATTAACCTTACTAGTT	1487
GI12.10	AAA-----AAAAAACCCTGTATAAACTGTATAATTATGAACCCCATTAACCTTACTAGTT	1485
	** *****	
<i>S. ph</i>	CCGCCCTGCCTGGACCATCCTTGGATTGGGATCCAAATATGTTGAATTACAATATTTTG	1528
GI12.4	CCGCCCTGCCTGGACCATCCTTGGATTGGGATCCAAATATGTTGAATTACAATATTTTG	1537
GI12.12	CCGCCCTGCCTGGACCATCCTTGGATTGGGATCCAAATATGTTGAATTACAATATTTTG	1544
GI12.2	CCGCCCTGCCTGGACCATCCTTGGATTGGGATCCAAATATGTTGAATTACAATATTTTG	1547
GI12.10	CCGCCCTGCCTGGACCATCCTTGGATTGGGATCCAAATATGTTGAATTACAATATTTTG	1545

<i>S. ph</i>	ATCCTTGATTTGTAGCATTTTCTCGATCACTAAAATCTTTGATTGTCAAACAGTTAT	1586
GI12.4	ATCCTTGATTTGTAGCATTTTCTCGATCACTAAAATCTTTGATTGTCAAACAGTTAT	1595
GI12.12	ATCCTTGATTTGTAGCATTTTCTCGATCACTAAAATCTTTGGTTGTCAAACAGTTAT	1602
GI12.2	ATCCTTGATTTGTAGCATTTTCTCGATCACTAAAATCTTTGGTTGTCAAACAGTTAT	1605

A *S. tuberosum* cv. 'Désirée'-ből klónozott és a SpudDB-ből kinyert *S. tuberosum* Phureja csoport *GI.12* promóter fragmentumok szekvencia összehasonlítása. -2837 bp-tól -1586 bp-ig és -1586 bp-tól +59 bp-ig terjedő *GI.12* fragmentumokat PCR-rel amplifikáltuk a 'Désirée' genomi DNS-éből az StGI.12 -2837 Fw és StGI.12 -1586 R, valamint az StGI.12 -1586 Fw és az StGI.12 +59 R primer párokkal. A primerek szekvenciái az 5. mellékletben találhatóak. A fragmentumokat a pGEM-T[®] Easy vektorba klónoztuk és négy rekombináns klón DNS-ét szekvenáltattuk meg. A Clustal Omega program segítségével hasonlítottuk össze a szekvenciákat. A PlantRegMap által jelzett *cisz* szabályzó elemeket színessel emeltük ki. A sárga színnel kiemelt régió a BBR-BPC család (PGSC0003DMG400003719 és/vagy PGSC0003DMG402029444) feltételezett kötőhelye, míg a zöld színnel kiemelt régió az ERF-type (PGSC0003DMG400040046, PGSC0003DMG400002185, PGSC0003DMG400014541, és/vagy PGSC0003DMG400013402) feltételezett kötőhelye.

M10. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Szakkikkek:

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Z. (2022): *In silico* characterization and expression analysis of *GIGANTEA* genes in potato. *Biochemical Genetics*, 60(6):2137-2154.

ODGEREL, K., JOSE, J., **KARSAI-REKTENWALD, F.**, FICZEK, G., SIMON, G., VÉGVÁRI, GY., BÁNFALVI, Z. (2022): Effects of the repression of *GIGANTEA* gene *StGI.04* on the potato leaf transcriptome and the anthocyanin content of tuber skin. *BMC Plant Biology*, 22:249.

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, Zs. (2023): A *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* gén szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. *Kertgazdaság*, 55(2023)2.

Konferencia kiadványok:

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J. (2021): Regulation of *GIGANTEA* genes in potato. In: Scientific Conference of PhD Students of FAFR, FBFS and FHLE SUA in Nitra with international participation. Proceedings of abstracts on occasion of the Science and Technology Week in the Slovak Republic. November 10, Nitra, Slovak Republic, Abstract pg. 14.

VILLÁNYI, V., ODGEREL, K., **KARSAI-REKTENWALD, F.**, BÁNFALVI, Zs. (2021): Az oltvány hatása a burgonya koraiságára és a gumók metabolit összetételére. XVII. Növénynevelési Tudományos Napok, Martonvásár, március 24-25. (ISBN 978-963-8351-48-7)

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Z. (2022): Regulation and function of the *GIGANTEA* gene *StGI.04* in potato. *Fiatel Biotechnológusok Országos Konferenciája*, Gödöllő, április 11-12. (ISBN 978-963-269-999-8)

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Zs. (2022): A *GIGANTEA* gének szerepe és szabályozása burgonyában. XVIII. Növénynevelési Tudományos Napok, Keszthely, május 11-12. (ISBN 978-963-269-987-5)

BÁNFALVI, Z., **KARSAI-REKTENWALD, F.**, ODGEREL, K., JOSE, J. (2022): Regulation and function of *GIGANTEA* genes in *Solanum tuberosum* cultivar 'Désirée'. *Book of Abstracts*,

4th International Conference on Plant Biology – 23rd SPPS Meeting. 6-8 October, Belgrade, Serbia. (ISBN 978-963-269-987-5)

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, Zs. (2023): A CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) hajtásfejlődést befolyásoló szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. XXIX. Növénynevelési Tudományos Napok, Martonvásár, április 26-27. (ISBN: 978-963-8351-49-4)

Előadások:

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., JOSE, J., BÁNFALVI, Zs. (2021): A *GIGANTEA* gének szerepe és szabályozása burgonyában. GBI Napok, Gödöllő, december 14-15.

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., BÁNFALVI, Zs. (2023): Burgonya *GIGANTEA* mutánsok izolálása és jellemzése. GBI Napok, Gödöllő, november 30-december 1.

KARSAI-REKTENWALD, F. (2024): A *GIGANTEA* gének szabályozása és szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában. Új Nemzeti Kiválósági program Konferencia, Gödöllő, március 20.

12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Először is szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Bánfalvi Zsófiának, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy ezzel a témával foglalkozzak. Köszönöm támogatását, szakmai segítségét és szakértelmét. Szeretnék köszönetet mondani társ-témavezetőmnek, Dr. Veres Anikónak is a segítségével.

Őszinte köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Villányi Vandának és Dr. Khongorzul Odgerelnek, és a kiadványok, cikkek társszerzőinek. Hálás vagyok Kiss Monika Teklának technikai segítségével, az RNS izolálásért, a növények *in vitro* szaporításáért, transzformációjáért és üvegházi körülmények közti felneveléséért. Szeretném megköszöni Dr. Gyula Péternek a gCDF1 konstrukciók létrehozását.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Növénytudományi Doktori Iskola oktatóinak, adminisztratív dolgozóinak, a Doktori és Habilitációs Tanácsnak és a MATE Genetika és Biotechnológia Intézet dolgozóinak segítségükért.

A kutatást az NKFI NN_124441 és a K_146328 pályázati források támogatták. Külön szeretném megköszönni a pénzügyi támogatást a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP23-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alapból finanszírozott támogatásért.

Végül szeretném kifejezni köszönetemet férjemnek és családomnak bátorításukért és szeretetükért.