

SZENT ISTVÁN EGYETEM

**ABIOTIKUS ÉS BIOTIKUS STRESSZEKSEL SZEMBEN
REZISZTENCIÁT EREDMÉNYEZŐ DNS-SZEKVENCIÁK
EXPRESSZIÓJA BÚZÁBAN**

Doktori értekezés

ÁY ZOLTÁN

**Gödöllő
2014**

A doktori iskola

Megnevezése: Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskola

Vezetője: Dr. Helyes Lajos, az MTA doktora
egyetemi tanár
SZIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Tanszék

Tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

Témavezető: Dr. Pauk János, az MTA doktora
kutatási igazgatóhelyettes
Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.

.....
Dr. Helyes Lajos
iskolavezető

.....
Dr. Pauk János
témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
GYAKRAN ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK	5
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. A búzatermesztés jelentősége	9
2.2. Gyomproblémák és gyomszabályozási lehetőségek a búzatermesztésben	10
2.3. Széles spektrumú herbicid-hatóanyagok és szelektivitásuk háttere	12
2.4. A Magyarországon előforduló leggyakoribb gabonavírusok és kártételük	17
2.4.1. Árpa csikos mozaik	18
2.4.2. Árpa sárga törpülés	21
2.4.3. Búza törpülés	24
2.4.4. Búza csikos mozaik	25
2.5. Vírusrezisztencia kialakításának lehetőségei – különös tekintettel az RNS-interferencia jelenségére	27
2.6. Vírusfertőzések kimutatásának lehetőségei növényi mintákból	33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
3.1. Széles spektrumú gyomirtószerrerrel szembeni rezisztencia vizsgálata	37
3.1.1. A vizsgált hatóanyag letális dózisának megállapítása	37
3.1.2. Herbicidrezisztencia teszt	37
3.1.3. Statisztikai értékelés	38
3.1.4. Egyéb kísérleti körülmények	38
3.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata	38
3.2.1. Transzformációs vektormolekulák	39
3.2.2. Búza szövettenyésztés és növényregeneráció	40
3.2.2.1. Növényanyag	40
3.2.2.2. <i>In vitro</i> körülmények	41
3.2.2.3. Növénynevelés üvegházban és klímakamrában	41
3.2.3. DNS-szekvenciák bejuttatása búza sejtekbe	42
3.2.4. Markergénre alapozott szelekció	43
3.2.5. Transz-szekvenciák kimutatása növényi mintákból	44
3.2.5.1. Genomi DNS izolálás	44
3.2.5.2. Összes RNS izolálás	44
3.2.5.3. A transz-szekvenciák kimutatásához szükséges primerek	45
3.2.5.4. Polimeráz láncreakciók	45
3.2.5.5. Nukleinsavak detektálása gélelektroforézissel	46
3.2.6. Homozigóta búzapopulációk létrehozása portoktenyésztéssel	48
3.2.7. BSMV-fertőzéssel szembeni rezisztencia tesztelése	49
3.2.7.1. A vírusátvitel hatékonyságának ellenőrzése	49
3.2.7.2. Vírusrezisztencia teszt	50
3.2.7.3. Statisztikai értékelés	51
3.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel	52
3.3.1. Növényanyag	52
3.3.2. Szerológiai teszt	53
3.3.3. Molekuláris teszt	53

4. EREDMÉNYEK	55
4.1. Széles spektrumú gyomirtószerrel szembeni rezisztencia vizsgálata	55
4.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata	62
4.2.1. Vektormolekulák beépítése búzába	62
4.2.2. Homozigóta búzatörzsek előállítása	68
4.2.3. BSMV-fertőzéssel szembeni rezisztencia tesztelése	72
4.2.3.1. A vírusátvitel hatékonyságának ellenőrzése	72
4.2.3.2. Vizsgálatok a tenyészidőszakban	74
4.2.3.3. Vizsgálatok a betakarításkor	80
4.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel	86
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	89
5.1. Széles spektrumú gyomirtószerrel szembeni rezisztencia vizsgálata	89
5.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata	91
5.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel	94
5.4. Új tudományos eredmények	96
6. ÖSSZEFOGLALÁS	97
7. SUMMARY	98
MELLÉKLETEK	99
M1. Irodalomjegyzék	99
M2. A kísérleteink során alkalmazott kitek használati protokollja	119
M2.1. Promega #Z3100 RNS-izoláló kit	119
M2.2. Loewe Biochemica #07004 DAS-ELISA kit	120
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	121

GYAKRAN ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK

λ -DNS	<i>EcoRI</i> és <i>HindIII</i> enzimekkel emésztett λ -fág DNS méretmarker
2,4-D	2,4-diklórfenoxiecetsav
ACCáz	acetyl-koenzim A karboxiláz enzim
AHAS	hidroxiecetsav-szintetáz enzim
ALS	acetolaktát-szintetáz enzim
<i>bar</i>	bialafosz rezisztencia gén
bp	bázispár
BSMV	árpa csíkos mozaik vírus – Barley stripe mosaic <i>hordeivirus</i>
BYDV	árpa sárga törpülés vírus (PAV törzs) – Barley yellow dwarf <i>luteovirus</i>
cDNS	kópia-DNS
DAS-ELISA	kettős antitest szendvics enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat – double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EPSP	5-enolpiruvilsikimát-3-foszfát
GS	glutamin-szintetáz enzim
ICTV	Nemzetközi Vírustaxonomiai Társaság – International Committee on Taxonomy of Viruses
kDa	kiloDalton (molekulaméret mértékegysége)
MCPA	2-metil-4-klórfenoxiecetsav
MCS	multi klónozó hely – multi cloning site
MR-DNS	MassRuler [®] DNS méretmarker
MS	Murashige és Skoog által kidolgozott tápközeg
NAA	naftilecetsav
Nos-T	nopalín-szintetáz gén terminátor régiója
ORF	nyitott leolvasási keret – open reading frame
<i>pat</i>	foszfinotricin-N-acetiltranszferáz enzim génje
PAT	foszfinotricin-N-acetiltranszferáz enzim
PCR	polimeráz lánreakció – polymerase chain reaction
PDR	patogén eredetű rezisztencia – pathogene derived resistance
psi	pound/inch ² (héliumnyomás mértékegysége biológiai berendezésben)
PT	L-foszfinotricin
PTT	foszfinotricin-tripeptid
RISC	RNS-indukált csendesítő komplex – RNA induced silencing complex
RT	szobahőmérséklet – room temperature
RT-PCR	cDNS-szintézissel induló reverz-transzkriptáz polimeráz lánreakció
siRNS	kis interferáló RNS – small interfering RNA
SPAD	soil plant analysis development (a klorofilltartalommal arányos mértékegység nélküli mutató)
TDH	transzformáns dihaploid
TMV	dohány mozaik vírus – Tobacco mosaic <i>tobamovirus</i>
WDV	búza törpülés vírus – Wheat dwarf <i>mastrevirus</i>
WSMV	búza csíkos mozaik vírus – Wheat streak mosaic <i>tritimovirus</i>
YDV _s	sárga törpülés vírusok – yellow dwarf viruses

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Magyarországon a gabonafélék kutatásának nagy hagyományai vannak, hiszen ezek a fajok foglalják el mezőgazdasági művelésre alkalmas területeink jelentős részét, így nagymértékben hozzájárulnak a bruttó hazai termék összértékéhez. Legfontosabb gabonánk a búza, amelynek nemesítése másfél évszázadra tekint vissza hazánkban. A nemesítés sikereit maguk a fajták testesítik meg. Jóllehet egyre határozottabban érezhető a külföldi vetőmagforgalmazó cégek piaci előretörése, még mindig elmondható, hogy a magyar búzatermesztés főként hazai nemesítésű genotípusokra támaszkodik.

Az MTA Szegedi Biológiai Központ koordinálásával a 2000-es években két konzorciális nagyprojekt is támogatást kapott a búza adaptációs képességének és termésbiztonságának javítására, abiotikus és biotikus stresszekkel szembeni ellenállóképességének fokozására, illetve a rezisztencia mechanizmusok tanulmányozására, a legmodernebb módszerekkel történő megismerésére. A két konzorciumban több magyar kutatóintézet és egyetemi tanszék szakemberei vettek részt. Genomikai, növényélettani, növénykórtani, agrotechnikai és növénynemesítési tudományterületen születtek ígéretes eredmények, amelyek hatása vélhetően még több év múlva is érezhető lesz, hiszen egy-egy új búzafajta előállítása akár évtizedes munkát is igényelhet (Dudits, 2006).

Dolgozatom témája is e konzorciális pályázatok munkatervébe illeszkedett. Amint a címben is szerepel, kutatócsoportunk két részfeladatba kapcsolódott be. Mindkettő középpontjában olyan mechanizmusok kidolgozása, illetve jellemzése állt, amelyek a búza termésstabilitását hivatottak növelni. Napjaink szélsőséges évjáratái miatt ugyanis egyre fontosabbá válik kultúrnövényeink alkalmazkodóképessége. Búzában a legnagyobb termésvesztést ma is az aszály okozza, de jelentős károk forrásai lehetnek a gyomok és a betegségek is. Kísérleteinket e két utóbbi témakörben végeztük. A biotechnológia és a vegyipar fejlődésével újabb és újabb vegyületek kapnak szerepet a gabonafélék gyomirtásában. Közöttük olyanok is, amelyek úgynevezett széles spektrumú szerek, tehát hatásuk a kultúrnövényekre is kiterjed, amit abiotikus stresszként értelmezünk. Léteznek azonban rezisztenciagének, amelyekkel kivédhető a hatásuk, így ezek a herbicidek szelektívvé tehetők. Munkánk során egy ilyen gén hatását vizsgáltuk meg egy modell búzatörzsben üvegházi körülmények között. Ezzel párhuzamosan a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközponttal együttműködésben egy ugyancsak fontos kísérletsorozatba kezdtünk. Köztudott, hogy évjáratól függően a vírusok mint biotikus stresszfaktorok jelentős károkat tehetnek a búzavetésekben. Rezisztenciát kialakítani velük szemben igen nehéz, mert a szóba jöhető gének száma kevés és azok általában vad fajokban találhatók. A kenyérbúza és vad rokonainak keresztezésekor számos hátrányos tulajdonság kerülhet át a tenyésanyagba, bonyolulttá téve a szelekció folyamatát. Mindez kiküszöbölhető a kórokozók genomszekvenciáinak felhasználásával, amelyek indukálják a növényi sejt ősi géncsendesítő mechanizmusát, az RNS-interferenciát. Munkánk második

szakaszában e rendszer hatékonyságát tanulmányoztuk modell búzatörzseken ugyancsak üvegházi körülmények között.

Értekezésemben számos növény, kártevő és vírus tudományos neve szerepel. Mivel a taxonómia épp a modern biotechnológiai módszereknek köszönhetően gyakran kényszerül egyes fajok átnevezésére vagy más csoportba sorolására, e helyen megemlítem, hogy a növényfajok tudományos neveit Priszter (1999) kézikönyve szerint használtam a disszertációban. A vírusvektor szervezetek megnevezésekor az ITIS (Integrated Taxonomic Information System – *http 1*) adatbázisára támaszkodtam, a vírusok esetében pedig az ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses – *http 2*) adatbázisát vettem alapul.

Eredményeink remélhetőleg hozzájárulnak a búzában működő rezisztencia mechanizmusok alaposabb megismeréséhez.

Célkitűzések:

1. Egy széles spektrumú gyomirtószer-rezisztenciagént hordozó búzatörzs tényleges herbicid-ellenállóságának megállapítása a vad típusú búza genotípushoz képest.
2. Az extrém magas koncentrációban alkalmazott glufozinát-ammónium terméskialakító komponensekre gyakorolt komplex hatásának megismerése.
3. Olyan DNS-szekvenciák beépítése búzába, amelyek az RNS-interferencia indukálása révén rezisztenciát eredményezhetnek egy vagy több, Magyarországon gyakran előforduló gabonavírussal szemben.
4. A kialakított vírusrezisztencia hatékonyságának bizonyítása legalább egy kórokozóval szemben.
5. Annak megállapítása, hogy a DNS-konstrukciók nyomon követésére kifejlesztett primereink alkalmasak-e szántóföldi vírusfertőzések kimutatására. A polimeráz láncreakció és a klasszikusnak számító szerológiai vírusdetektálás érzékenységének, hatékonyságának összehasonlítása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A búzatermesztés jelentősége

A közönséges búzát (*Triticum aestivum* L.) az emberiség évezredek óta ismeri, a legelterjedtebb és a legrégebben termesztett kultúrnövények egyike. Már a történelem hajnalán felismerte az ember, hogy szükség esetén egyedül kenyéren is fenntarthatja magát, mivel a búza tápértéke nagyobb az összes gabonáénál (Jolánkai, 2005). Elő-Ázsiában található a búza géncentruma, ahonnan a történelem előtti időkben terjedt el Ázsiában, Európában és Afrikában. Amerikába és Ausztráliába az újkorban került. Szabó és Bocz (1996) úgy vélik, hogy a búza gazdasági jelentősége nagyfokú ökológiai alkalmazkodóképességében rejlik, hiszen termőterülete a trópusoktól majdnem a sarkvidékig terjed. Sokoldalúságát fokozza, hogy vannak őszi és tavaszi változatai is. Magyar (1987) a faj népszerűségének okai között említi, hogy jó egyensúlyban van szénhidrát- és fehérjetartalma, teljes gépesítettséggel termesztethető és hosszú időn keresztül jól tárolható. Termelésének színvonalát lényegében három tudományterület: a gépesítés, az agrokémia és a növényi genetika együttes eredményei határozzák meg. FAO-adatok szerint ([http 3](#)) napjainkban a legjelentősebb búzatermesztő országok India, Kína, Oroszország, USA, Ausztrália és Kazahsztán.

Magyarországon a gabonatermesztés természeti adottság, sőt nemzeti kincsnek kell rá tekinteni. Alternatívája semmilyen társadalmi vagy gazdasági megfontolás alapján nem lehet (Balla, 2002). Elsősorban belföldi élelmezési céllal termesztjük a gabonaféléket, ugyanakkor a termés jelentős mennyiségét értékesítjük export formájában, illetve az állatok takarmányozására használjuk fel. Hazánkban az országos szántóterület kétharmadát foglalják el az ebbe a csoportba tartozó fajok. Közülük legnagyobb vetésterülete a búzának van, az elmúlt évszázad során egymillió hektár körül alakult évente. A Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint 2012-ben 1.070.021 hektárról 4.010.991 tonna búzatermést takarítottak be ([http 4](#)), 2013-ban pedig 1.092.087 hektárról 5.089.125 tonnát (Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, 2013).

Hazánk vetésszerkezete már-már túlzottan gabonaközpontú, a búza vetésterülete meg is haladta az optimális vetésszerkezet adta lehetőségek maximumát. Mégis minden évben célként fogalmazódik meg a minél több és minél jobb minőségű búzatermés elérése. Rossz stratégiát választanánk, ha ezt a vetésterület további növelésével akarnánk megvalósítani, ugyanis Jolánkai (2005) szerint már jelenleg is vetésváltási- és elővetemény-problémával küzdünk. Az ebből következőleg óhatatlanul kialakuló monokultúrás gazdálkodás pedig számos növénytáplálási, növényvédelmi és talajművelési nehézség forrása lehet. Így tehát az egységnyi területen elérhető hozam fokozását kell célul kitűznünk, ami korántsem lehetetlen vállalkozás, hiszen a jelenlegi átlaghozamok szintje jócskán elmarad a búzafajták genetikai termőképességétől. Terméspotenciál alatt a növényfajok, illetve fajták genetikailag meghatározott legnagyobb termőképességét értjük, amely optimális

időjárási, talajadottsági, agrotechnikai, valamint víz- és tápanyagellátási feltételek teljesülése esetén érhető el olyan földrajzi területen, amelyhez az adott genotípus adaptálódott, és ahol a kártevőkkel, gyomokkal, kórokozókkal és más stresszfaktorokkal nem kell számolni. Mértéke általában szimulációs modellekkel számszerűsíthető (Evans és Fischer, 1999). A NÉBIH adatai szerint a jelenleg forgalmazott búzafajták termőképessége hektáronként meghaladja a 10 tonnát.

A különböző abiotikus és biotikus stresszek a genetikailag meghatározott terméspotenciál és a realizált termésátlagok közötti különbséget növelik, amit nemcsak a termelőknek, hanem a növénynevelőknek is szem előtt kell tartaniuk. Biotikus stressz alatt értjük a gyomok, kártevők és kórokozók kultúrnövényekre gyakorolt hatását. Abiotikus stresszként tekintünk a hősokra (fagy vagy forróság), légköri- és talajaszálya, légmozgásra, tápanyaghiányra vagy -többletre, nehézfém-szennyezésre, stb. Speciális abiotikus stressznek foghatók fel a biotikus stresszeket okozó szervezetek elleni peszticidkezelések is. A stresszek általában összetett formában jelentkeznek. Hatásuk eredője okozza a termőhely- és évszámhatásként definiált jelenséget, ami az egyes kultúrnövény-genotípusokra jellemző termésstabilitásban, illetve termésingadozásban ölt testet.

2.2. Gyomproblémák és gyomszabályozási lehetőségek a búzatermesztésben

A közelmúltban befejeződött világfelmérés alapján mintegy 76 faj sorolható a világ legveszélyesebb gyomnövényei közé (Hunyadi és mtsai, 2011). A gyomok különösen a kultúrnövények fiatal állapotában okoznak fejlődési elmaradásban megnyilvánuló, irreverzibilis károkat. Térparazitizmusukkal elfoglalják a haszonnövények elől a helyet, ami a termőterületek csökkenésével jár. A gyomnövények tömegei, hatalmas példányai az amúgy is szűkösen rendelkezésre álló vizet elpárologtatják a vetett növények elől. Nagy levélfelületük transzspirációja többszörösen felülmúlhatja a kultúrnövények vízfelhasználását, mivel ugyanakkora tömeggyarapodáshoz sokkal több vízre van szükségük. Egyes fajok akár 30-szor több nitrogént is felvehetnek a talajból, mint a búza. A sűrűn gyomos vetésben kompetíció alakul ki a fényért, emiatt a növények az optimálisnál magasabbak, de gyengébbek lesznek. Mivel a tápanyag nagy részét felemészti a versengés, kevesebb lesz a termés. Az árnyékolás következtében a napfény nem hatol be a vetésbe, így a kultúrnövény szára nem erősödik meg, és az ilyen vetés könnyebben megdől. Közvetetten azáltal is káros a gyomnövények jelenléte, hogy számos kórokozó és kártevő köztes gazdái lehetnek. A gyomok tenyészideje általában jóval hosszabb, mint a kultúrnövényeké. Kalászos gabonafélékben még 80 % körüli a víztartalmuk, amikor a termesztett növény már teljes érésben van. A magas nedvességtartalmú biomassza betakarítása óriási nehézséget okoz és lassítja a munkát. A gyommagvakkal szennyezett termés mindig kisebb értékű, mint a tiszta. Végül soron a gyomok megdrágítják a termelést, mert a fertőzött táblán előállított kevesebb termésre rendszerint sokkal több munkát és költséget kell fordítani, mint a gyomok nélkül elérhető többre (Ujvárosi, 1973).

Őszi kalászosokban korai vetés és csapadékos október esetén már ősszel megindulhat az erőteljes gyomosodás, míg késői vetésben vagy száraz időjárási körülmények között a gyomok csírázása az enyhébb téli napokra és a kora tavaszi időszakra esik. Vetés utáni csapadékos időjárás esetén az ősszel kelő, áttelelő egyéves fajok, illetve az ősszel és tavasszal egyaránt csírázó nyár eleji egyévesek tömegesen jelenhetnek meg az őszi vetésű gabonatóblákon. Ezeket általában kiegészítik a tavasszal csírázó nyárutói egyévesek, valamint az évelő fajok.

Egy hatékony gyomszabályozási programnak egyaránt része a megelőzés és a védekezés is. A megelőzés módszerei például a gyommagmentes vetőmag használata, a vetésforgó minél precízebb megtervezése, vagy az okszerű talajművelés. Megelőzéssel általában csak részben sikerül elérni a kitűzött célt, ezért valamilyen formában célzott védekezésre is sor kerül a gyakorlatban. A védekezés célja a gyomok egyedszámának a kártételi küszöb alá csökkentése, vagy akár a gyompopulációk teljes kiirtása egy adott területről. Megkülönböztetünk agrotechnikai, mechanikai, biológiai és vegyszeres védekezési eljárásokat (Berzsenyi 2011a). A gyomnövények elleni küzdelemben a mezőgazdaság egészen az 1940-es évek derekáig az agrotechnikai és a mechanikai védekezési módszerekre volt utalva. Franciaországban, Amerikában és Németországban már az 1880-as években történtek próbálkozások bizonyos kemikáliák felhasználására ezen a területen. Rézszulfát híg oldatával például sikeresen irtottak ki vadrepét a gabonavetésekből. Vasgalic, kénsav és ásványolaj készítményekkel is végeztek kísérleteket, de széleskörűen egyik módszer sem terjedt el. A korszerű vegyszeres gyomirtási kutatások az 1940-es évek elején kezdődtek, amikor megállapítást nyert, hogy az alfa-naftilecetsav nátriumsójának oldatával permetezett kísérleti zabvetésben a kétszikű gyomok elpusztultak, a zab viszont nem károsodott. Zimmerman és Hitchcock vizsgálatai pedig arra az eredményre vezettek, hogy a 2-metil-4-klórfenoxiecetsav (MCPA) és a 2,4-diklórfenoxiecetsav (2,4-D) vízben oldható sói szelektív herbicid hatásúak (Rao, 2000). Az MCPA és a 2,4-D gyakorlati sikere nyomán lázas kutatómunka kezdődött a vegyipari üzemek és a tudományos intézetek laboratóriumaiiban. Különböző vegyületek tízezreit szintetizálták és próbálták ki. Számptalan felfedezés született, újabb és újabb gyomirtószeresek használatát téve lehetővé. Az egész világon 2004-ben forgalmazott 45 milliárd USD értékű peszticid közel fele herbicid volt, ennek pedig 83 %-át nyolc növénycsoportban (kalászosok, gyapot, gyümölcs- és zöldségfélék, kukorica, repce, rizs, szója, cukorrépa) használták fel (Kádár, 2010). Magyarországon a gyomirtószeres 1953-tól vannak forgalomban. Az 1969. évi hivatalos növényvédőszer-jegyzékben 45 forgalomba hozatalra és kísérleti felhasználásra engedélyezett készítmény szerepelt, amelyekben hatóanyagként 24 herbicid fordult elő. Napjainkban a kémiai úton történő gyomszabályozás hazai volumenére jellemző, hogy a növényvédő szereket gyártó magyar vállalatok és külföldi cégképviseltek címjegyzékében 2013-ban 56 db cég szerepelt, amelyek kínálatából összesen 104 db vegyszer volt engedélyezett kalászos kultúrákban végzendő kémiai gyomirtásra (Ocskó és mtsai, 2013).

A herbicidek széles körű használatának több oka van. Lehetővé teszik a gyomok szabályozását a sorokon belül és a keskeny sortávú kultúrák sorközeiben. Több veszélyes, vegetatív úton szaporodó évelő gyom is hatékonyan szabályozható velük. Használatuk nagyobb rugalmasságot tesz lehetővé az agrotechnikai rendszerben. Kevesebb növényből állhatnak a vetésciklusok és lehetőség van egy vagy több talajművelési eljárás elhagyására. Gyorsan hatnak, és nagymértékű gyomborítottság esetén is eredményesekek (Berzsenyi, 2011a).

2.3. Széles spektrumú herbicid-hatóanyagok és szelektivitásuk háttere

A széles spektrumú herbicidek egyes növényi anyagcsere utak – például a fotoszintézis, pigment bioszintézis, mitózis vagy esszenciális aminosav-bioszintézis – gátlása révén fejtik ki hatásukat. Gyakran egyidejűleg több élettani folyamatot is befolyásolhatnak (Mulwa és Mwanza, 2006). Elsőként a növekedést befolyásoló, hormonszerű hatóanyagok – mint a 2,4-D vagy a dicamba – kerültek kereskedelmi forgalomba, amelyek gabonafélékben ma sem veszítettek jelentőségükből. A triazin és bromoxinil hatóanyagú szerek a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc egyik elektronakceptora, a plasztokinon megkötődésének akadályozásával fejtik ki hatásukat a II. fotoszintetikus kaszkádrendszerre (Szigeti és Lehoczki, 2003). Korábban ez a vegyszercsoport dominált, mára kissé veszített jelentőségéből. A legújabb fejlesztésű herbicidek a növényi pigmentek (klorofillok vagy karotinoidok) bioszintézisének gátlásával érik el a kívánt hatást. A triketon, difenil-éter, vagy ciklikus imid hatóanyagok a protoporfirinogén-oxidáz enzim gátlása révén az oxigéngyökök abnormális felhalmozódása miatt okozzák a növény pusztulását (Wakabayashi és Böger, 2002). A sejtosztódást blokkoló hatóanyagok közé tartozó dinitro-anilinek a csíranövények osztódószöveteknek mitózist zavarják meg. A tubulin fehérje alegységekhez kötődnek, amelyek így nem tudnak mikrotubulusokká alakulni. Új sejtek nem képződnek, s a növény már korai fejlődési stádiumban elhal (Nyporko és mtsai, 2009). Az aminosav-bioszintézis a herbicidek által az egyik leggyakrabban támadott anyagcsereút. Az elágazó szénláncú aminosavak, mint a leucin, az izoleucin vagy a valin az ALS [acetolaktát-szintetáz; nevezik hidroxiecetsav (AHAS) -szintetáznak is] enzim segítségével alakulnak ki a növényi sejtekben. Az ALS működését számos hatóanyag képes blokkolni: szulfonilurea, imidazolinon, pirimidin-szulfonamid, pirimidinil-szalicilát (Green, 2007). A gyűrűs szénláncú aminosavak, mint a triptofán, a tirozin és a fenilalanin is elengedhetetlenek a fehérje-, hormon-, lignin-, flavonoid- és alkaloid-bioszintézis során, ám működésük nem lehetséges az EPSP (5-enolpiruvilsikimát-3-foszfát)-szintetáz enzim hiányában. Ennek szubsztrátja a foszfoenol-piruvát, amelynek megkötése révén az EPSP-szintetáz blokkolható. Ilyen elven fejtik ki hatásukat például a széles körben alkalmazott glifozát hatóanyagú herbicidek (Duke és Powles, 2008).

Néhány évtizeddel ezelőtt a *Streptomyces viridochromogenes* és a *S. hygroscopicus* gombák által termelt speciális peptid antibiotikumról számoltak be Bayer és mtsai

(1972), illetve Lea és mtsai (1984). Ez a PTT-nek (foszfinotricin-tripeptid) elnevezett antibiotikum két molekula L-alanint és egy molekula PT-t (L-foszfinotricin) tartalmaz. Feltételezések szerint a PT két molekula foszfoenolpiruvát, egy molekula acetil-koenzim A és a metil-kobalamin egy metilsoportja felhasználásával keletkezik tizenhárom lépésben (Schwartz és mtsai, 2004; Schinko és mtsai, 2009). A PTT molekula bioaktív komponense a PT, amely a glutaminsav szerkezeti analógjaként belépve az aminosavsztézis folyamatába irreverzibilisen gátolja a nitrogén-metabolizmus kulcsenzimét, a GS-t (glutaminsztetáz). A GS több alegységből áll, ammónia felhasználásával katalizálja a glutaminsav→glutamin átalakulást. Gátlása révén a kontroll sejtekhez viszonyítva a glutaminsav-szint és az ammónium-ion felhalmozódás akár százszoros értéket is elérhet (Tachibana és mtsai, 1986). Berzsényi (2011b) ugyanakkor ismerteti, hogy a glutamin hiányán és a toxikus ammóniaakkumuláción kívül a PT hatással van számos más anyagcsereútra is: módosítja a membrántranszport-folyamatokat, csökkenti a protein- és nukleotidkoncentrációt, valamint hatására foszfoglitolát, glikolát és glioxalát halmozódik fel. Utóbbi gátolja a ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz-oxigenáz (Rubisco) aktivitását, ami a fotoszintézis csökkenéséhez vezet. Mindezek következtében a PT-nek baktericid, fungicid és herbicid hatásai vannak. Növények esetében a PT-kezelést követően 2-4 órával lelassul a fotoszintézis, 2-5 napon belül levélklorózis, deszikkáció és nekrosis figyelhető meg, végül a növények elpusztulnak (Wendler és mtsai, 1992).

A glufozinát-ammónium egy ún. proherbicid, amely a növényi sejtekben PT-né alakul, ezért a perzselő hatású növényirtók közé tartozik. Eredetileg a Hoechst cég fejlesztette ki burgonya, pillangósok és káposztarepce defoliálására. A talajban felezési ideje mindössze 3-20 nap, utóhatása így nem várható. Tudományos neve ammónium-DL-homoalanin-4-il-(metil)-foszfinát vagy ammónium-(3-amino-3-karboxipropil)-metil-foszfinát. Gőztenióját tekintve nem illékony, vízben 25 °C-on jól oldódik. Elvileg 1,0 kg/ha hatóanyaggal 95 % feletti hatékonyság érhető el (Kádár, 2010). Számos márkanév alatt forgalmazzák, mint például Basta, Challenge, Finale, Radicale vagy Liberty.

Széles hatásspektrumú szerek alkalmazásakor a fentiekben ismertetett folyamatok elvileg mind a gyom-, mind a kultúrnövényekben végbemennek, így fitotoxikus hatásuk miatt a herbicidkezeléseket speciális abiotikus stresszként értelmezzük. A PT-re például több mint 40 egyszikű és több mint 150 kétszikű faj érzékeny (Metz és mtsai, 1998). Ebből következően az ilyen herbicideket úgy lehet szelektívvé tenni, ha a gyomokhoz képest eltérő hatásmechanizmust alakítunk ki egy adott kultúrnövényben. A szelektivitás a szenzitív és toleráns növénytípusok anyagcsereje közötti biokémiai különbségeken alapul. Ilyen különbségek felismerésének és/vagy kialakításának leghatékonyabb útja a biotechnológia modern módszereinek – vegyszerterheléses szelekcióval egybekötött *in vitro* szövettenyésztés, mutagenézis vagy genetikai transzformáció – integrálása a klasszikus növénynemesítés folyamatába. Ez az irányvonal képezi az egyik legnagyobb változást a gyomszabályozási technológiában azóta, hogy a herbicidek kereskedelmi forgalomba kerültek az 1940-es évek közepén (*I. táblázat*).

1. táblázat. Köztermesztésben lévő, különböző herbicidhatóanyagokkal szemben rezisztens kultúrnövények. Duke (2005) összefoglaló tanulmánya, valamint Kukorelli (2012) disszertációja nyomán

genetikai módosítással hatóanyag		sejtszintű szelekcióval hatóanyag		
	növényfaj		növényfaj	
bromoxinil	gyapot repce	triazin	repce	
		szetoxidim	kukorica	
glufozinát- ammónium	repce kukorica gyapot	cikloxidim	kukorica	
		imidazolinon	napraforgó kukorica repce cukorrépa gyapot búza rizs	
glifozát	szója repce kukorica gyapot cukorrépa lucerna		napraforgó szója cukorrépa gyapot szemes cirok	
			szulfonil-urea	napraforgó szója cukorrépa gyapot szemes cirok

Végeredményben a korábban nem szelektív hatóanyagok szelektívként használhatók, sőt szelektivitásuk nem faj-, hanem fajtaspecifikus lesz (1. ábra). A toleráns fajtában a kezelések a kelést követően is elvégezhetők, illetve a vegyszerek biztonságosan alkalmazhatók akkor is, ha a kérdéses fajta olyan fajba tartozik, amelyben az adott hatóanyag fitotoxicitás miatt eredetileg nem engedélyezett (Berzsenyi, 2011b).

Spontán vagy indukált mutagenézis révén megváltozott ALS-t eredményező géneket sikerrel alkalmaztak számos növényfaj nemesítése során. Bebizonyosodott, hogy a kívánt tulajdonság eléréséhez elég néhány vagy akár egy pontmutáció is, ami strukturálisan megváltoztatja az ALS herbicidkötő oldalát, s az inhibitor molekulák nem tudnak az enzimhez kapcsolódni. A mutáns enzimet kódoló gén hagyományos keresztezéses nemesítési programmal átvihető ígéretes kiindulási populációkba. Az így előállított, totális posztemergens kezelésben részesíthető növényváltozatok világszerte elfogadottak, sőt népszerűek, mivel nem tartalmaznak fajidegen gént. Ilyenek például a ClearfieldTM védjeggyel ellátott, imidazolinonnal szemben ellenálló búzafajták (Dahmer és mtsai, 2002; Mergoum és mtsai, 2009) és napraforgóhibridek (Pfenning és mtsai, 2008), illetve a szulfonilurea-rezisztens napraforgóhibridek (Jocic és mtsai, 2011). Szintén példaként említhetjük az ACCáz-gátló cikloxidimokkal szemben toleráns kukoricahibrideket (Vancetovic és mtsai, 2009). A multinacionális cégek 2004 óta számos, EU-fajtalistán szereplő hibridet értékesítenek a hazai piacon. Az imidazolinon- és a szulfonilurea-toleráns

napraforgók 2005-ben, illetve 2006-ban jelentek meg, míg cikloxidim-toleráns kukoricákat 2008 óta, imidazolinon-toleráns káposztarepcét pedig 2012 óta természetesen a gazdálkodók (Kukorelli, 2012). Népszerűségüket jelzi, hogy 2013-ban már a magyar napraforgó vetésterület több mint felén természetesen Clearfield™ hibrideket, a NÉBIH pedig 2008-ban külön csoportot hozott létre számukra az állami regisztrációs fajtakísérletekben.



1. ábra. Foszfinitricinrezisztencia genotípus- és hatóanyagspecifikusságának vizsgálata rizzsel. Permetezéssel végzett kezelések balról jobbra: 1.: vad típusú fajta + glufozinát-ammónium; 2.: *bar*⁺ fajta + glufozinát-ammónium; 3.: vad típusú fajta + glifozát; 4.: *bar*⁺ fajta + glifozát. (Pauk János üvegházban végzett kísérlete)

Transzformáció alkalmazásakor a gyomirtószer hatóanyaga által gátolt enzim túlermelletésével, az enzim módosított változatának kialakításával – a herbicid molekulák nem tudnak kötődni a mutáns célenzimhez – vagy egy detoxifikáló fehérjét kódoló DNS-szekvencia növényi sejtekbe juttatásával érhető el a kívánt tolerancia (Dudits és Heszky, 2000). A génexpresszió javítása önmagában jelenleg nem használatos. A mutáns génnel való transzformáció több esetben is sikerre vezetett, azonban nagy hátránya, hogy a toleranciát kiváltó mutációk a gyomokban is kialakulhatnak. A detoxifikálásra alapozott stratégiánál csak minimális esély van erre. James (2013) adatai szerint 2013-ban világviszonylatban 18 millió termelő 27 országban 175 millió hektáron vetett genetikailag módosított növényeket. A globálisan megtermelt szójának 79 %-a, a gyapotnak 70 %-a, a kukoricának 32 %-a, a repcének pedig 24 %-a genetikailag módosított volt. Az említett 175 millió hektár körülbelül négyötöd részén herbicidrezisztens fajtákat termeltek.

Kultúrnövények esetében eredményesen használható herbicidrezisztencia gének általában talajlakó mikroorganizmusokból izolálhatók. A *Cupriavidus necator* baktérium egyedüli szénforrásként képes hasznosítani a 2,4-D-t. Hat *tfd* gént azonosítottak, amelyek a 2,4-D-t 2,4-DCP-vé alakító 2,4-D dioxigenáz enzim működéséért felelősek. Közülük a *tfdA* gént dohányba és gyapotba építve Streber és

Willmitzer (1989), valamint Bayley és mtsai (1992) rezisztenciát értek el 2,4-D-vel szemben. Bromoxinil-rezisztenciát a hatóanyaggal szennyezett talajokban előforduló *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* baktériumból izolált nitriláz enzim *bxn* génjével sikerült kialakítani. A nitriláz ugyanis nem fitotoxikus 3,5-dibróm-4-hidroxibrómbenzoosavvá alakítja át a bromoxinilt. Eddig gyapotban, burgonyában és vöröshereben születtek eredmények (Culpepper és York, 1997; Eberlein és mtsai, 1998; Dear és mtsai, 2003), illetve Kanadában 2000-ben BXN jelzéssel kereskedelmi forgalomba került egy repcefajta is. Mégsem jósolható nagy jövő ennek az irányvonalnak, mivel a bromoxinilnek fűfélékre és egyes kétszikűekre csak korlátozott hatása van (Berzsenyi, 2011b). *Bacillus subtilis*-ből izolált protoporfirinogén-oxidáz enzim *hemY* génjének hatását dohányban és rizsben megvizsgálva rezisztenciát figyeltek meg a difenil-éterek közé tartozó oxifluorfen hatóanyag ellen (Choi és mtsai, 1998; Lee és mtsai, 2000). A sejtosztódásban zavart okozó dinitro-anilinnel szemben szójababban és rostlenben alakítottak ki rezisztenciát egy mutáns α -tubulin gén túltermelésével (Yemets és mtsai, 2008; Yemets és mtsai, 2009). A *Salmonella typhimurium*-ból izolált *aroA* gén mutáns EPSP-szintetáz enzimet kódol egy aminosavcsere ($\text{Gly}_{100} \rightarrow \text{Ala}$) következtében, s a mutáns enzimhez a glifozát kevésbé tud kötődni. E gén működése jó lehetőség glifozát-rezisztens növények előállítására (Whang és mtsai, 2003). Hasonló eredményre vezet a *Pseudomonas* fajokból származó glifozát-oxidoreduktáz enzim *gox* génjének használata is, amikor a hatóanyag detoxifikálása révén teljesíthető a kitűzött cél, mivel az enzim katalizálja a glifozát lebontását aminometilfoszforsavvá és glioxilsavvá. Ez az alapja az ún. Roundup ReadyTM növényeknek (Dill, 2005). Sikerrel alkalmazták ezt a megoldást többek között szója, kukorica, repce, gyapot, cukorrépa és búza esetében is. Bizonyos köztermesztésben lévő fajtákba mind a *gox* gént, mind a mutáns EPSP-szintetáz gént beépítették.

A glufozinát-ammóniummal szemben rezisztens kultúrnövények nemesítése a PTT-t termelő sugárgombák esetében megfigyelt mechanizmuson alapszik, amelynek kulcsenzime a PAT (foszfinotricin-N-acetiltranszferáz). Ez az enzim úgy detoxifikálja a PT-t, hogy acetilálja annak szabad aminocsoportját. A PAT-enzimet kódoló *pat* gént a *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 törzséből izolálták Strauch és mtsai (1988), míg az ugyanolyan hatást kiváltó *bar* (bialafosz rezisztencia) gént *S. hygroscopicus*-ból (Thompson és mtsai, 1987). Mindkét gén 183 aminosavat kódol, amelyek 85 %-os homológiát mutatnak egymással, az inhomogén szekvenciák pedig a nem kódoló régiókban találhatóak (Wohlleben és mtsai, 1988). A glufozinát-ammónium a *bar/pat* rendszer felfedezése óta már nemcsak a vegyszeres állományszárításban és a totális gyomirtásban használatos, hanem alkalmassá vált a fenti rezisztenciagének valamelyikét expresszáló növények szelekciójára, illetve a szelektív gyomirtásra is. Napjainkig repce-, kukorica-, szója- és cukorrépa-fajták glufozinát-ammóniummal szemben toleráns változatai kerültek köztermesztésbe Liberty LinkTM kereskedelmi néven, bár kevésbé elterjedtek, mint glifozát-rezisztens társaik. Gabonafélék esetében is már

több kutatócsoport sikerrel állított elő a glufiznát-ammóniummal szemben toleráns genotípusokat (Janakiraman és mtsai, 2002; Tan és mtsai, 2006).

Kevésbé ismert azonban, hogy a *bar* gén milyen mértékű rezisztenciát alakíthat ki a növényekben, illetve hogy a magas koncentrációban adagolt glufozinát-ammónium milyen elváltozásokat okozhat egy rezisztensnek vélt búzatörzs egyedeiben. A disszertáció első részében ezekre a kérdésekre igyekszünk választ adni.

2.4. A Magyarországon előforduló leggyakoribb gabonavírusok és kártételük

A vírus szó az ókorban mérges nyálkát jelentett. Biológiai értelme az idők során folyamatosan változott ugyan, mindig benne lappangott azonban a titkos, kifürkészhetetlen, veszedelmes jelentés is. Az újkori tudományos felfedezéseknek köszönhetően ma már sokat tudunk e „mérgező” lényekről, amelyek kórképével gyakran szembesülhetünk gabonatóbláinkon.

A növényi vírusok közül legalaposabban ismert a TMV (tobacco mosaic *tobamovirus* – dohány mozaik vírus). A világ csaknem minden pontjáról izolálták, számos törzsét jellemezték. Nem jelent veszélyt az őszi búzára, mégis fontos említést tennünk róla, hiszen szinte minden jelentős virológiai felfedezés e kórokozóval kapcsolatos. Ez volt az első növényvírus, amelyet leírtak, kristályos formában tisztítottak, elektronmikroszkóppal lefényképeztek, illetve bizonyították nukleinsavának fertőzőképességét (Creager és mtsai, 1999).

A gabonafélék virális kórokozóinak nagy részét csak a második világháború után azonosították, ám azok természetesen már korábban is jelen voltak, és a tudományos ismeretek hiánya miatt esetenként komoly fejtörést okoztak a növénytermesztőknek. Legtöbbször tápanyag-ellátási zavarra gyanakodtak a szakemberek a tünetek láttán, illetve ismeretlen gombák kártételének vélték azokat. A TMV-vel kapcsolatos tudományos felfedezések azonban fellebbentették a fátylat az addig ismeretlen kórokozókról. Világszerte nagy erővel indultak meg a kutatások a virális patogének azonosítására a gabonafélék körében is. Számos vírus megismerése fűződik pl. Harold McKinney vagy John Slykhuis nevéhez. Wiese (1987) még csak 30 víusról tett említést, amelyek képesek megfertőzni a búzát, míg Brunt és mtsai (1996) már 55 ilyen kórokozóról számoltak be. Lapierre és Signoret (2004) szerint a *Triticum* fajok természetes körülmények között 57 vírusra fogékonyak, kísérletes körülmények között pedig további 42-re. A növényvírusok internetes adatbázisa, a VIDE (Virus International Data Exchange) szerint 51 vírus ismert, amelyre a *T. aestivum* fogékony (<http> 5).

Közülük csak kevés fordul elő Magyarországon. Az 1960-as évek végéig azt közölték a növénytermesztési szakkönyvek, hogy hazánkban a búza vírusos megbetegedései ismeretlenek. Azonosításuk jóval a legelső nemzetközi publikációk után történt meg, zömmel az 1980-as években. Elsőként a BYDV-t (Barley yellow dwarf *luteovirus* – árpa sárga törpülés vírus) írta le Szirmai (1967) árpán, majd Szunics és Szunics (1984) búzán. Ezt követte a BSMV (Barley stripe mosaic *hordeivirus* – árpa csíkos mozaik vírus) publikálása (Milinkó és Remete, 1984).

Király (1987) a búza vírusos betegségei közül egyedül a BYDV-t tárgyalta, a WDV (Wheat dwarf *mastrevirus* – búza törpülés vírus), a BMV (Brome mosaic *bromovirus* – rozsok mozaik vírus) és a WSMV (Wheat streak mosaic *tritimovirus* – búza csíkos mozaik vírus) kártételét még csak valószínűsítette. Az 1984-ben indított gabonavirologiai program keretében további patogéneket sikerült azonosítani (Pocsai és Barabás, 1985; Gáborjányi és mtsai, 1988), és néhány éven belül a hazánkban ismertté vált gabonapatogén vírusok száma kettőről tízre emelkedett. Az 1990-es évektől a hazai – szegedi és martonvásári – nemesítőházak is bekapcsolódtak a kutatásba és évről évre meghatározták a kísérleti területeiken jelen lévő vírusokat, így kirajzolódott azok fertőzőképessége és gyakorisága. Papp és mtsai (1996) két vizsgálati évet (1994 és 1995) értékelve a BSMV-t és a BMV-t találták a legelterjedtebbnek – megcáfolva azt a korábbi nézetet, miszerint a BYDV szinte kizárólagos jelentőséggel bír. Mesterházy és mtsai (2002) egy ötéves kísérletsorozatban (1994-1999) ötféle vírust (BMV, BSMV, BYDV, WDV és WSMV) diagnosztizáltak tág térállásban, szeptemberben vetett búzanövényekből. A kórokozók gyakoriságát az évjárat erősen befolyásolta. Számos esetben akár 3-5 vírushalmaz is kimutatható volt ugyanabból a levélből, ami a kevert vertözések fontosságára irányította a figyelmet. A kísérleti átlagot tekintve a WSMV fordult elő a minták zömében. Pribék és mtsai (2006) említik, hogy 2002-ben országos epidémia alakult ki, tetemes termésvesztést okozva az őszi árpán, a kenyér- és a durumbúzán. Felmérésükben az 1996-2005 periódust vizsgálva minden esetben a WDV dominanciáját állapították meg, emellett 2001-2003 között jelentős BYDV-fertőzést is találtak. Papp és mtsai (2011) rámutattak, hogy a vírusösszetétel a tenyészidőszakon belül is megváltozhat. Négy éven át (2007-2010) április végén és június elején gyűjtöttek be tünetes búzaleveleket. A korábban szedett minták 39 %-ában WSMV-t, 30 %-ában WDV-t, 25 %-ában BYDV-t, 4 %-ában BSMV-t, 2 %-ában pedig BStV-t (Brome streak mosaic *rymovirus* – rozsok csíkos mozaik vírus) azonosítottak. Ezzel szemben a későbben gyűjtött levelek 50 %-ában WDV-t, 14 %-ában BYDV-t, 13 %-ában WSMV-t, 11 %-ában BMV-t, 10 %-ában BSMV-t, 2 %-ában pedig BStV-t találtak. Mindezen fenti tapasztalatok alapján a hazánkban előforduló búzavírusok közül kiemeltük a négy leggyakoribb kórokozót (2. táblázat és 2. ábra), amelyeket a továbbiakban részletesebben tárgyalunk, hiszen ezeket világviszonylatban is a legveszélyesebbek között tartják számon.

2.4.1. Árpa csíkos mozaik

A BSMV a *Hordeiviridae* családba tartozó, világszerte elterjedt kórokozó. Azonosították Euráziában, Észak-Amerikában, Egyiptomban, Ausztráliában, sőt a Csendes-óceáni szigetvilágban is. A *T. aestivum*-on kívül további 40 növényfaj érzékeny rá, amelyek főként a *Poaceae*, a *Chenopodiaceae*, az *Asteraceae* és a *Solanaceae* családokból kerülnek ki ([http 5](http://5)). Virionja általában egyenes pálcika alakú, 112-150 nm hosszú és 18-24 nm széles, megfigyelhető rajta egy 3-4 nm átmérőjű hosszanti csatorna (Harrison és mtsai, 1965). Genomja egyszálal, lineáris

2. táblázat. A Magyarországon leggyakrabban előforduló gabonavírusok

Vírus tudományos neve	Első nemzetközi és hazai leírása	Akronim
Barley stripe mosaic <i>hordeivirus</i>	McKinney, 1951 Milinkó és Remete, 1984	BSMV
Barley yellow dwarf <i>luteovirus</i>	Oswald és Houston, 1951 Szirmai, 1967	BYDV
Wheat dwarf <i>mastrevirus</i>	Vacke, 1961 Gáborjányi és mtsai, 1988	WDV
Wheat streak mosaic <i>tritimovirus</i>	McKinney, 1937 Pocsai és Barabás, 1985	WSMV



2. ábra. A Magyarországon leggyakrabban előforduló gabonavírusok tünetei.

A: BSMV (forrás: [http 6](#)), B: BYDV (forrás: [http 7](#)),

C: WDV (forrás: [http 8](#)), D: WSMV (forrás: [http 9](#))

RNS-ből áll, teljes mérete 10 kb. Osztott genomja van (α , β , és γ), amelyek külön-külön kapszidálódnak. Méretük sorrendben 3,8 kb, 3,3 kb, illetve 2,8 kb. A γ -genom mérete törzsenként eltérő lehet. A genomok nukleotidszekvenciáját Gustafson és Armour (1986) közölték. Az α -genom egy ORF-et (open reading frame – nyitott leolvasási keret) tartalmaz, amely az RNS-függő RNS-polimeráz enzim 130 kDa méretű metiltranszferáz/helikáz alegységét kódolja. A β -genom kódolja a 22 kDa-os köpenyfehérjét, illetve a 60, 17 és 14 kDa-os mozgási fehérjéket. A γ -genomon két ORF található, amelyek az RNS-függő RNS-polimeráz enzim 87 kDa-os polimeráz alegységét és egy 17 kDa-os regulátor fehérjét kódolnak, utóbbi a β -genom géneinek translációját szabályozza, valamint szerepe van a patogenezisben és a gazdanövény RNS-interferencián alapuló védekezési mechanizmusának gátlásában (Petty és mtsai, 1990; Jackson és mtsai, 2009). A BSMV-t gyakran használják a VIGS (virus induced gene silencing – vírus indukálta géncsendesítés) rendszerekben, ezáltal a funkcionális genomikai kutatásokban (Holzberg és mtsai, 2002). A mechanizmus alapja, hogy a vírus γ -genomján található regulátor fehérje génje elé vagy mögé idegen nukleinsav-szekvenciák építhetők, de ettől a módosítástól a kórokozó nem veszíti el virulenciáját. A beépített szekvenciával komplementer növényi RNS-ek degradálódnak és a megfertőzött növényben funkcióvesztés lép fel (Joshi és mtsai, 1990; Tai és mtsai, 2005). Így térképeztek fel számos anyagcsere utat, például búzában az *Lr1*, *Lr10* és *Lr21* gének által kialakuló levélrozsda-rezisztencia mechanizmusokat (Scofield és mtsai, 2005; Campbell és Huang, 2010).

A BSMV vektorszervezetek nélkül, mechanikai úton terjed az egészséges és a fertőzött növények leveleinek egymáshoz dörzsölődése következtében kialakuló, vagy növényápoló munkagépek okozta mikrosérülések által. Túléléséhez és terjedéséhez a vetőmaggal történő átvitel is jelentősen hozzájárulhat, amelynek mértéke az egyes gazda-patogén kapcsolatok szerint eltérő. A maggal terjedő vírusok szinte kivétel nélkül pollennel is átvihetők. Igaz ez a BSMV-re is, de mivel a búza elsődlegesen öntermékenyülő faj, ez a terjedési mód nem túl jelentős (Horváth, 1972; Glits és Folk, 1993).

A BSMV a gabonaféléket szisztémikusan fertőzi, míg egyes fajokat (cukorrépa, fehér libatop, dohány) csak lokálisan. Szisztémikus fertőzés hatására a kloroplasztiszok alakja kerekké válik, megduzzadnak és összetapadnak úgy, hogy a szomszédos organellek között a citoplazma egy része hozzájuk tapad, illetve betüremkedik. Továbbá különböző, egyesével álló, membránhoz kötött vezikulumok jelenhetnek meg a belső és a külső membrán között. A fertőzött sejtek kloroplasztisztaiban periferiális vezikulumok találhatóak. Ezek az elváltozások a fotoszintetikus aktivitás csökkenéséhez vezetnek (McMullen és mtsai, 1978; Goodman és mtsai, 1991). Egyszikűek levéllemezen a levélerekkel párhuzamos, kifakult mozaikcsíkok jelentkeznek, kétszikűeknél pedig klorotikus helyi léziók láthatók. Árpán és búzában a tünetek az enyhe mozaikcsíkoktól a teljes nekrotizisig változhatnak. Júniusban már gyakori a kórképek maszkírozódása. Nagymértékű a beteg növények növekedésgátlása, gyenge a bokrosodás, rövidülnek a kalászkok, sőt sterilitást is tapasztaltak mind a pollen, mind a petesejt esetében, valamint a

kalászképződés teljes elmaradását. Véső soron a fertőzés erősségétől és a természetett fajta fogékonyságától függően a BSMV akár 60-70 %-os termésveszteséget is okozhat (Carrol, 1980; Jezewska és Trzmiel, 2010).

2.4.2. Árpa sárga törpülés

Elsőként a BYDV átvitelét ismertetjük, mert a Cornell Egyetemen ez alapján nevezték és különítették el a kórokozó törzseit (Rochow és Eastop, 1966; Rochow, 1969). A vírus vektorszervezetei az *Aphididae* család tagjai közül kerülnek ki. A levéltetvek vírusátvitelben betöltött szerepét már a 20. század első évtizedeiben bizonyították. Szűrő-szívó szájszervük révén ezek a rovarok a legfontosabb természetes vírusvektorok (Pribék, 1999). William Rochow kutatócsoportja öt BYDV törzset azonosított aszerint, hogy négy bizonyos levéltetűfaj milyen hatékonysággal viszi át azokat a betegről az egészséges növényre (3. táblázat).

3. táblázat. BYDV törzsek elkülönítése az 1960-as években New Yorkban végzett megfigyelések alapján

Törzs neve	Legjellemzőbb vektorszervezet	
	tudományos neve	magyar neve
RPV	<i>Rhopalosiphum padi</i> L.	zselnicemeggy levéltetű
MAV	<i>Macrosiphum avenae</i> (Fabricius)*	gabona levéltetű
RMV	<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch)	zöld kukorica levéltetű
SGV	<i>Schizaphis graminum</i> (Rondani)	zöld gabona levéltetű
PAV	<i>R. padi</i> L. és <i>M. avenae</i> (Fabricius)*	

* Jelenlegi taxonómia szerint a tudományos neve *Sitobion avenae* (Fabricius).

Ezzel a felosztással érvényre jutott a kutatók azon véleménye, hogy a sárga törpülés betegségért nem egyetlen kórokozó, hanem patogének csoportja a felelős, s ezért a BYDV-t, mint gyűjtőnevet használták tovább. A BYDV egyetlen törzse sem bizonyult eddig abszolút vektorspecifikusnak. Ezért jobban közelít a valósághoz, ha vektorspecifitás helyett a törzsek transzmissziós fenotípusáról beszélünk, ami azonban mindig csak az adott kísérleti rendszerre jellemző, általánosítani nem lehet (Power és Gray, 1995). A törzsek és a vektorok transzmissziós fenotípusa feltehetőleg sohasem lesz teljesen ismert, hiszen a fenti öt törzsön kívül továbbiakat is publikáltak (Plumb, 1974, Zhang és mtsai, 1983), a potenciális levéltetű vektorok száma pedig meghaladja a 40-et (Blackman és Eastop, 1989). Lister és Rochow (1979) bizonyították, hogy az eredetileg leírt öt vírustörzs szerológiailag is különbözik egymástól és mind egy-egy szerotípusnak fogható fel, vagyis immunológiai módszerekkel jól elkülöníthetők.

A BYDV gyűjtőnéven említett kórokozók taxonómiai besorolása sok változáson ment át. Alapjában véve a *Luteoviridae* családba tartoznak, ami máig megállja a helyét. Ezen belül három nemzetséget találunk: *Luteovirus*, *Polerovirus* és *Enamovirus* (Domier, 2012). Eredetileg minden BYDV-törzset a *Luteovirus* csoportban helyeztek el. Elsőként Gill és Chong (1979) módosítottak Rochow rendszerezésén, akik citopatológiai vizsgálataik alapján két alcsoportot hoztak létre. Egyikbe a PAV, MAV és SGV, másikba az RPV és RMV törzseket sorolták. Eredményeiket szerológiai vizsgálatok is megerősítették (Paliwal, 1979). Halbert és mtsai (1992) számos vírustörzs transzmissziós fenotípusát és szerotípusát elemezve rámutattak, hogy azok gyakran nincsenek összhangban egymással, ezért a taxonómiát érintő döntések előtt alaposabb, több tulajdonságot figyelembe vevő elemzést javasoltak. Ehhez kiváló eszközöket nyújtott a molekuláris biológiai és biotechnológiai módszerek rohamos fejlődése, amelyek ugyancsak alátámasztották a két alcsoport létjogosultságát. A BYDV-törzsek nem strukturális géneinek hibridizációs vizsgálata során a PAV és a MAV mutatta a legnagyobb homológiát, míg az RPV és RMV törzsek között erős inhomogenitást tapasztaltak (Martin és D’Arcy, 1990; Vincent, 1991). A teljes genom szekvenálásával bizonyosodott be, hogy az RPV-törzs nem a *Luteovirus*, hanem a *Polerovirus* nemzetségbe tartozik. Az Egyesült Királyságban 1997-ben tartott konferencián javaslatot tettek átnevezésére. Az új nevet [CYDV-RPV (Cereal yellow dwarf *polerovirus* – gabona sárga törpülés vírus)] az ICTV be is vezette (D’Arcy és mtsai, 2000). A *Polerovirus* és a *Luteovirus* nemzetség között alapvető különbségek vannak például az RNS-függő RNS-polimeráz enzim géneiben (Miller és mtsai, 2002), illetve a *Luteovirus*-okkal ellentétben a *Polerovirus* csoport rendelkezik egy speciális, genomhoz kapcsolt fehérjével és nulladik ORF-fel. Utóbbi egy géncsendesítést gátló szekvenciát kódol (Mangwende és mtsai, 2009). A legújabb eredmények azt is igazolták, hogy az RMV-törzs ugyancsak a *Polerovirus* nemzetségbe tartozó, ám a CYDV-től genetikailag jól elkülönülő, teljesen új faj (Krueger és mtsai, 2013). Új neve a kutatócsoport javaslatára MYDV-RMV (Maize yellow dwarf *polerovirus* – kukorica sárga törpülés vírus). Jelenleg a vírusos sárga törpülés kórokozóiként tartjuk nyilván a BYDV-törzseket, a CYDV-törzseket, a WYDV-t (Wheat yellow dwarf *polerovirus* – búza sárga törpülés vírus) és az MYDV-t. Gyűjtőnévként az YDV-s, azaz sárga törpülés vírusok elnevezés használatos.

A betegséget több mint 50 országban írták le. Világviszonylatban és Magyarországon is az erősen virulens PAV a leggyakoribb szerotípus, ezért dolgozatunk további fejezeteiben a BYDV akroním alatt a BYDV-PAV törzset értjük. Ismert gazdanövényeinek száma 150 feletti, a *Poaceae* család hat alcsaládjából öt érintett. A termesztett fajokon kívül rengeteg egynyári és évelő gyom is gazdanövénye, de tünetek nem mindegyiken jelennek meg (D’Arcy, 1995; Jarosova és mtsai, 2013). A BYDV két fő vektorszervezete a zselnicemeggy levéltetű (*R. padi* L.) és a gabona levéltetű (*S. avenae* Fabr.). Mindkettő kis vagy közepes méretű, az egész világon elterjedt, holociklusos fejlődésű levéltetű faj. Ezek a rovarok vírusvektor tevékenységükkel nagyobb kárt idéznek elő, mint a növénynedvek szívásával. A BYDV mellett számos más vírus átvitelére is képesek.

A BYDV-t perzisztens, cirkulatív módon terjesztik. A vektor és a vírus kapcsolata hosszú ideig, napokig, sőt esetenként a vektor élete végéig fennmarad. A vírus a vektor testében cirkulál, de ott nem replikálódik. A BYDV és általában a luteovírusok a növényi szállítóedényekben helyezkednek el. A floémból felszívott szövetnedvvel együtt felvett vírus a levéltetű emésztő szervrendszerében eljut az utóbélig, s annak falán áthatolva bejut a keringési rendszerbe. A hemolimfa a járulékos nyálmirigyhez szállítja a vírusrészecskéket, amelyek bejutnak a nyálcsatornába. A vektor akkor válik fertőzőképpé, amikor a vírus a nyálában megjelenik. A kórokozó stabilitását és az átvitel sikerességét egy 61 kDa tömegű szimbionin fehérje biztosítja, amely kapcsolódik a vírus köpenyfehérjéjének egyik alegységéhez, ezáltal lehetővé teszi, hogy a vírus megtartsa integritását a hemolimfában. A szimbionin fehérjét a levéltetvek bélrendszerében található *Buchneria* baktériumok termelik. Antibiotikum kezeléssel visszaszorítva ezen mikroorganizmusok szaporodását, a virion elvesztette integritását (Basky, 2005).

A BYDV genomja egyszálas lineáris RNS-ből áll. A genom nem osztott, mérete 5,6 kb és hat darab, nagyon rövid ORF-et tartalmaz a 3' véghez közel. Az 1. és a 2. 15 bázis hosszban átfed egymással, a 4. pedig a 3-on belül helyezkedik el (Miller és mtsai, 1988). A 3-6. ORF-ek expresszióját szubgenomi RNS-ek segítik (Dinesh-Kumar és mtsai, 1992). Az 1-2. ORF az RNS-függő RNS-polimeráz helikáz és polimeráz alegységeit kódolja (Habibi és Symons, 1989). A 3. ORF kódolja a köpenyfehérjét és az ún. RTD-t (readthrough domain). Ezek határozzák meg a virion szerkezetét, illetve segítik a vírusok áthatolását a növényi és állati membránokon (Brown és mtsai, 1996; Peter és mtsai, 2009). A 4. ORF fehérjeterméke a vírusok sejtről sejtire történő mozgását biztosítja (Schmitz, 1997). Frameshift mutációk segítségével Young és mtsai (1991) megállapították, hogy az 5-6. ORF is elengedhetetlen a fertőzőképesség fenntartásához.

A betegség tünetei általában 7-20 nappal a fertőződés után jelentkeznek először a levéllemezek szélein és csúcsi részén. Árpánál halványsárga, zabnál narancssárga, vörös és lila, búzán, rozson és tritikálén sárga, néha vörös, míg rizsen sárga színváltozásokat figyeltek meg. Hideg hatására gyakrabban alakulnak ki vörös és lila foltok. A klorózisok a későbbiekben szétterjednek az egész levéllemezen, majd bekövetkezik a nekrozis. A zöld színvesztés az öregebb leveleken kifejezettebb. További jellegzetes kórkép a hajtások növekedésgátlása, a rövid internódiumok következtében fellépő törpülés, illetve a gyökértömeg-csökkenés. A beteg növény később kalászol ki, mint az egészséges. A szemek száma és tömege lecsökken. Olyan szintű is lehet a fertőzés, hogy a növény ki sem kalászol, vagy a kalások fejletlenek és sterilek maradnak. A tünetek erősségét befolyásolja a gazdanövény faja és fajtája, fertőzés kori fenofázisa, a vírus koncentrációja, valamint a környezeti tényezők (Irwin és Thresh, 1990; Horváth, 1995). Bonyolult megbecsülni a BYDV által okozott tényleges gazdasági károkat, mégis le kell szögezni, hogy világviszonylatban a gabonafélék egyik legpusztítóbb betegségéről van szó. Számos tanulmány született, amelyek a lehetséges terméskiesést 15-50 % közöttinek becsülik (Lister és Ranieri, 1995; Perry és mtsai, 2000; McKirdy és mtsai, 2002).

2.4.3. Búza törpülés

A WDV-t első ízben az egykori Csehszlovákiában írta le Vacke (1961). Azóta publikálták jelenlétét többek között Svédországban, Finnországban, Lengyelországban, Németországban, Spanyolországban, Kínában és Iránban, valamint Magyarországon is. A kórokozó a *Geminiviridae* családba, azon belül a *Mastrevirus* nemzetségbe tartozik, egyetlen hazai képviselője ennek a családnak (Érsek és Gáborjányi, 1998). Az ebbe a csoportba tartozó vírusok különlegessége, hogy ikerpartikulumú, viszonylag kisméretű (18-22 nm × 30-38 nm), látszólag izohedrális alakú virionokkal rendelkeznek, genomjuk pedig cirkuláris, egyszálú DNS-ből áll. A *Geminiviridae* családon belüli nemzetségek elkülönítésének alapja az, hogy az ikervirionok DNS-ének szekvenciája mennyire homogén egymással. A *Mastrevirus* nemzetségben azonos bázissorozatú DNS-t tartalmaznak az ikervirionok (Horváth, 1999a). Az osztályozás további alapját képezi az ORF-ek és az intergénikus régiók (IR) vizsgálata (Brown és mtsai, 2012).

Az egyszálú, cirkuláris genom 2,6-2,7 kbp méretű, kevés fehérjét kódol. A DNS-en 4 ORF van, kettő a pozitív polaritású virionszálon – V1 és V2 –, kettő pedig a negatív komplementer szálon – C1 és C2. A V1 mozgási fehérjét kódol, a V2 pedig a köpenyfehérjét. Utóbbinak a virion kapszidálása mellett szerepe van a vektorátvitelben és a szisztémikus vírusmozgásban is. A replikációhoz szükséges fehérjét (Rep – replication-associated proteins) a C1 és C2 ORF-ek együttesen kódolják, ezek rövid szakaszon átfednek egymással (Boulton és mtsai 2002; Kvarnheden és mtsai, 2002). A Rep-fehérjéknek sok funkciója van: specifikus DNS-felismerés, ATP/GTPáz aktivitás biztosítása a replikációhoz, köpenyfehérjégen promóterének aktiválása. E proteinek kölcsönhatását szegedi kutatók is tanulmányozták egy projekt keretében (Horváth és mtsai, 1998). A WDV-genom további részei az ún. LIR (large intergenic region) és SIR (short intergenic region). Előbbi erősen konzervált a *Geminiviridae* családban, és tartalmazza a replikációs origót (Palmer és Rybicki, 1998). A replikáció módját a nemzetség névadója, az MSV (Maize streak *mastrevirus* – kukorica csíkosság vírus) tanulmányozása során közzölték (Stanley, 1985; Stanley és Davis, 1989), de ezek a megfigyelések a WDV-re is igazak. Maga a nukleinsav-replikáció a gazdanövény sejtmagjában megy végbe intermedier kétszálú DNS-formák segítségével, ún. forgó kerék (rolling circle) formában. A mechanizmus révén rövid idő alatt sok másolat készül a genomról. A transzkripció a genom virion és komplementer száláról egyidőben történik (Gutierrez, 1999; Gafni és Epel, 2002).

„*Ez a rovar rendkívül káros és rövid időn belül kivégzi a búzavetéseket a jelentős elterjedése miatt. Előütünése április 10-én volt, a kár ekkor még nem nagy; a hőmérséklet emelkedésével azonban olyan rapid módra terjedt és olyan nagy kárt okozott, hogy már 100 hold őszi búzát ki kellett szántanunk. Az állat által megtámadott búzavetés rozsdapiros lett; mintha tűz perzselte volna végig.*” Emperl Ernő írta e sorokat Békésből, 1892. május 3-án. Levelében a csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dahlbom) kártételéről tett jelentést (Jablonowski, 1895). Még nem sejtette, hogy nem az állat elsődleges kárképét látta, hanem az általa

terjesztett vírus okozta a megdőbentő tüneteket. A WDV vektorszervezete ugyanis éppen a 3-4,5 mm-es méretű csikos gabonakabóca, amit szintén Vacke (1961) publikált elsőként. Hazánkban mindenütt előfordul, leggyakoribb kabócáink egyike. Az állat szívásával közvetlenül is gazdasági kárt okoz – ám fontosabb közvetett kártétele, a WDV terjesztése. A primer WDV fertőzés ősszel történik az imágókkal, a másodlagos pedig tavasszal, amikor a nimfák táplálkoznak (Lindblad és Sigvald, 2004; Manurung és mtsai, 2005). A vírus perzisztens módon terjed: nem replikálódik a rovarban és nem kerül át a petékbe. Vacke (1964) kísérletében az imágók a vírusbeteg növényen már 5 perces tartózkodás után felszívták a vírust és 1-4 napos inkubációs idő után fertőzőképessé váltak.

A mastrevírusok főleg egyszikű növényeket fertőznek. A termesztett fajok közül a WDV legfőbb gazdanövényei a búza, az árpa, a rozs és a zab. Lindsten és Vacke (1991) megfigyelték, hogy a kórokozó nem egyformán fertőzi a búzát és az árpát. Eredményeiket több kutatócsoport is megerősítette (Kvarnheden és mtsai, 2002, Köklü és mtsai, 2007), és a két változatot árpa-, illetve búzatörzsként nevezték el. Az árpátörzs nem fertőzi meg a búzát, de a búzatörzs átvihető árpára (Mechner és mtsai, 2003; Kundu és mtsai, 2009). Laboratóriumi körülmények között azonban Commandeur és Huth (1999) az árpátörzsszel is képes volt megfertőzni a búzát. A két törzs genomja 85 %-os homológiát mutat egymással. Mégis mindkettőt WDV-nek nevezik, mivel az ICTV a *Mastrevirus* nemzetségben 75 %-ra lecsökkentette az egy fajba tartozás kritériumát (Fauquet és mtsai, 2008). Megjegyezzük azonban, hogy létezik egy zabot fertőző törzs is, amely csak 70 %-os hasonlóságot mutat a búza- és árpátörzsszel, ezért Schubert és mtsai (2007) kezdeményezték új fajként való elkönyvelését ODV (Oat dwarf *mastrevirus* – zab törpülés vírus) néven.

A betegség tünetei búzán és árpán szinte egyformák. Drámaian lecsökken a fotoszintézis, a növények törpülnek, sárgulnak és feltűnően csokrosodnak. Jellemző a levelek kanalasodása, barna foltosodása, valamint a kalászolás elmaradása is. A termés kiesés akár 70 %-os is lehet (Horváth, 1995; Pocsai és Murányi, 2010).

2.4.4. Búza csikos mozaik

A WSMV a *Potyviridae* családba, azon belül a *Tritimovirus* nemzetségbe tartozik. Korábban a *Rymovirus* nemzetségbe sorolták, de Stenger és mtsai (1998) filogenetikai elemzéssel bizonyították ennek helytelenségét. Elsőként McKinney (1937) írta le az Egyesült Államokban, ahol máig az egyik legjelentősebb búzabetegség (Velandia és mtsai, 2010). A világ számos pontján bizonyították jelenlétét, így Európa különböző országaiban, Kanadában, Jordániában, Mexikóban, sőt Ausztráliában is. Magyarországon elsőként üvegházból gyűjtött mintában mutatták ki (Pocsai és Barabás, 1985), majd szántóföldön is (Gáborjányi és Nagy, 1988).

A virion hajlékony, pálcika vagy fonál alakú, 700 nm hosszú és 13 nm átmérőjű (Brakke, 1971). Amint az a *Potyviridae* családra általában is jellemző, az egyszálalás RNS-ből álló, 9,4 kb méretű genom elején mintegy 85-205 nukleotidos nem kódoló

régió található, amit egy igen hosszú ORF követ, s ez egyetlen nagyméretű poliprotein prekuzort kódol (Stenger és mtsai 1998). A poliprotein proteolitikus érése során 8-10 funkcióképes fehérje keletkezik. A génkifejeződés szabályozását a különböző proteáz enzimek időben eltérő expressziója teszi lehetővé (Riechmann és mtsai, 1992; Dougherty és Semler, 1993). A poliprotein aminoterminális végén helyezkedik el a proteináz funkciójú P1 fehérje, amely egy specifikus felismerőhellyel rendelkezik saját maga és a HC-Pro (helper component-proteinase – segítő proteináz) között. Nem specifikus helyeken kötődik az RNS-ekhez, és elengedhetetlen a hatékony vírusreplikációhoz (Verchot és Carrington, 1995). A HC-Pro-nak sok funkciója van. N-terminális régiója a levéltetvekkal terjedő potyvirusoknál kap szerepet, C-terminális vége pedig proteináz funkciójú és szerepe van a replikációban, valamint a poszttranszkripcionális csendesítés gátlásában is (Kasschau és mtsai, 1997). A CI (Cylindrical Inclusion protein – hengeres inklúziós fehérje) helikáz funkciójú, ezen kívül felelős a ribonukleotid hidrolízisért, illetve a vírus növényben való hosszú távú és sejtről sejtre történő mozgásáért (Fernandez és mtsai, 1995; Carrington és mtsai, 1998). További proteináz funkciójú fehérjék is képződnek, mint az NIa és NIb (Nuclear Inclusion protein), utóbbi a *Potyviridae* családban a legkonzerváltabb szekvencia, és a poliprotein vágásán kívül RNS-függő RNS-polimeráz aktivitása is van (Carrington és Dougherty, 1987). A köpenyfehérje a poliprotein C-terminális végénél található, szerepe van a vírus növényen belüli mozgásában is (Lane és Skopp 1983; Rojas és mtsai, 1997). A funkcionális fehérjék szinte minden lehetséges kombinációban képesek egymással kapcsolódni, homo-illetve heteromer komplexeket alkotni, ezáltal további funkciókat ellátni (Choi és mtsai, 2000).

A *Poaceae* család számos tagja lehet a WSMV gazdanövénye. Különböző mértékben ugyan, de a legtöbb búza-, árpa-, zab-, kukorica- és kölesfajta érzékeny a betegségre. A kalászos gabonák betakarítása és őszi vetése között árvakeléseken és vad fajokon (pl. *Echinochloa*, *Setaria spp.*) is gyakran megtalálható (Christian és Willis, 1993; Ellis és mtsai, 2004). Mindez összefüggésben van vektorszervezetével. A WSMV cirkulatív akarinoofil vírus. Slykhuis (1955) közölte elsőként, hogy az *Eriophyidae* (gubacsatkák) családba tartozó *Aceria tulipae* Keifer atkafajnak köze van a betegség terjedéséhez. A kórokozót csak a nimfák veszik fel, de terjesztéséért már mind a nimfák, mind az imágók felelősek. Az atka különböző növényekre (*Triticum*, *Agropyron*, *Allium spp.*) természetesen adaptálódott fiziológiai törzsei a vírusátvitelben differenciáltan viselkedtek. A búzáról származó vektortörzs nagyon hatékonyan (84-92 %), a hagymáról származó csak kevésbé hatékonyan (27-70 %), míg a tarackról izolált törzs alig (1 %) vitte át a WSMV öt törzsét (del Rosario és Sill, 1965; Orlob, 1966). Brakke (1971) kísérletében az állat 15-60 perc alatt vette fel a vírust és több mint 6 napig fertőzőképes maradt. Későbbi taxonómiai vizsgálatok rávilágítottak, hogy az *A. tulipae* atkafaj csak a *Liliaceae* családba tartozó növényeken él, a *Poaceae* család fajain valójában az *A. tosichella* telepszik meg, s ez a WSMV vektora (Jensen és mtsai, 1996; Seifers és mtsai, 1997). A rendkívül kicsiny (100-250 µm) atkák teste megnyúlt, henger alakú. Szűrő-szívó szájszervükkel a levelek fonákán táplálkoznak, s ha vírusoktól

mentesek, akkor kárképük szabad szemmel nem látható (Jenser és mtsai, 1998). A legújabb kutatási eredmények szerint az *A. tosichella* a WSMV mellett hatékonyan átviszi a TrMV-t (*Triticum mosaic poacevirus* – búza mozaik vírus) is, és mivel e két kórokozó szinergista, együtt fertőzve növelik a termés kiesést (Seifers és mtsai, 2009; Tatineni és mtsai, 2010). A WSMV képes vektor nélkül, vetőmaggal is terjedni, bár ennek hatékonysága jóval elmarad az atkákkal történő átvitelhez képest. Elsőként kukoricánál mutatták ezt ki (Hill és mtsai, 1974), néhány éve pedig Ausztráliában találtak Mexikóból származó fertőzött búza vetőmaggát (Jones és mtsai, 2005).

E betegség tünetei ugyancsak a gazdanövény levelein jelentkeznek először előbb a levélerekkel párhuzamos mozaikcsíkok, majd sárgulás, végül nekrozis formájában (Slykhuis, 1953). A beteg növényi sejtek citoplazmájában amorf zárványok figyelhetők meg (Langenberg, 1991), a leglátványosabb tünet azonban a hajtásszám csökkenése, amit több kutatócsoport is tanulmányozott. Shahvan és Hill (1984) 93 %-os, Hunger és mtsai (1992) 75 %-os redukciót mértek. Edwards és McMullen (1998) 19 tavaszi búza genotípus mesterséges inokulálásával állítottak be szántóföldi kísérletet és egyes fajtáknál 99 %-os szemterméscsökkenést regisztráltak. Byamukama és mtsai (2012) vizsgálatában a kontrollnál érzékenyebb búzafajtánál a WSMV fertőzés szignifikáns visszaesést eredményezett mind a hajtásszámban, mind a hajtás- és gyökértömegben.

2.5. Vírusrezisztencia kialakításának lehetőségei – különös tekintettel az RNS-interferencia jelenségére

Vírussal fertőződött, beteg növényt meggyógyítani igen nehéz, gyakran lehetetlen vállalkozás. Mégis egyes esetekben kívánatos, hogy értékes fajtákat vírusfertőzöttségük ellenére is fenntartsanak. Ennek egyik módja a speciális klímakamrákban végezhető hőterápia. Alkalmazása csonthéjas gyümölcsféléknél, szőlőnél, dísnövényeknél, burgonyánál régóta ismert. Hőterápiára érzékeny fajoknál szóba jöhetnek a kemoterápiás módszerek is (természetes vagy mesterséges inhibitorok), de ezek nem pusztítják el a vírusokat, csak akadályozzák azok replikációját és elterjedését a gazdaszervezetben. Gabonafélék szántóföldi növényvédelmében ezeket a módszereket egyáltalán nem alkalmazzák kis hatékonyságuk és költséges voltuk miatt.

Preventív módszerekkel jóval hatékonyabb lehet a vírusok elleni küzdelem, mint kuratív eljárásokkal. A megelőzés alapvető célja, hogy megakadályozza a gazdaparazita kapcsolat létrejöttét, vagy a már fertőzött növényből a vírus továbbterjedését. A mezőgazdaság sokáig csak a hagyományos agrotechnikai eljárásokra hagyatkozhatott. Helyes vetésforgó betartásával, megfelelő tápanyagellátással, a korai vetésidő elkerülésével, optimális hektáronkénti tőszám beállításával, a beteg növények eltávolításával, vírusmentes szaporítóanyagok használatával igyekeztek megvédeni a kultúrnövényeket. Ezek azonban csak rövid időre jelentenek mentességet, mert ha a gazdanövény fogékony, szinte bármelyik

fenofázisban megfertőződhet exogén forrásokból. Az agrokémia fejlődésével új lehetőség adódott a vírusok elleni prevencióra, mégpedig a vektorszervezetek vegyszeres gyérítése inszekticidekkel, akaricidekkel (Perring és mtsai, 1999). Ez azonban jelentős környezetterheléssel és az életközösségekbe történő káros beavatkozással járhat, sőt virológiai szempontból sem tökéletes. A nem perzisztens vírusokat ugyanis a vektorok néhány másodpercig tartó próbaszívással felveszik, és azonnal továbbterjesztik. Cirkulatív vírusok ellen hatékony lehet a vektorok irtása, ám egy adott kultúrnövény táblában a különféle vírusok együtt, komplexen fordulnak elő, ezért az inszekticidek használata erre a célra vitatható, és számolni kell a szerrezisztencia kialakulásával is a kártevők populációiban (Horváth, 1999b). A vírusok elleni legeredményesebb és legkörnyezetkímélőbb módszer a rezisztencianemesítés (Kegler és Spaar, 1993). A rezisztencia megnyilvánulhat a vírus növénybe jutásának, vagy a kórokozó növényben való replikációjának gátlásában. Mindkét esetben a gazdaszervezet, a patogén és (ha van) a vektor genotípusától, valamint a környezeti tényezőktől függ a rezisztencia megléte, illetve mértéke (4. táblázat).

4. táblázat. A gazdanövény lehetséges válaszreakciói a vírusfertőzésre. Ragetli nyomán módosították Goodman és mtsai (1991)

Válaszreakció	Tünetek súlyossága	Vírusok szaporodása
Fogékonyság	+++	+++
Tolerancia	±	++
Hiperszenzitivitás*	+++	+
Rezisztencia	±	±
Immunitás	-	-

*Csak a lézióban lévő sejtekre nézve súlyosak a tünetek.

Fogékony gazdanövényben jellegzetes tünetek és jelentős szisztemikus vírusszaporodás észlelhető. A toleránsnak nevezett növények a vírusreplikáció ellenére alig károsodnak, termésveszteségük is kicsi. Hiperszenzitivitás esetén a kórokozó a fertőzési helyen vagy annak közvetlen közelében lokalizálódik a léziót alkotó növényi sejtek programozott nekrozisa következtében. Rezisztens növényekben a vírusreplikáció gátlása nekrozisok hiányában is bekövetkezhet, mert a fertőzési helyeken lévő sejtek csak klorotikussá válnak, vagy semmilyen tünetet nem mutatnak. A megtámadott növény elkerüli a súlyos szisztemikus invázió következményeit, bár helyi károsodásokat elszenvedhet. A rezisztencia szélsőséges változata az immunitás, amikor a vírus nem tudja a gazdanövény anyagcseretermékeit és enzimszisztémáját hasznosítani saját szaporodása érdekében. Az immunis növény tulajdonképpen nem gazdája az adott vírusnak. Gyakorlati szempontból az immunis, a rezisztens, és a hiperszenzitív reakciókat adó

genotípusokat érdemes felhasználni, illetve kialakítani a nemesítés során. A toleráns növények ugyanis hiába tünetmentesek, a vírusok szaporodnak bennük, ezért rezervoárrá válnak és veszélyt jelenthetnek (Goodman és mtsai, 1991).

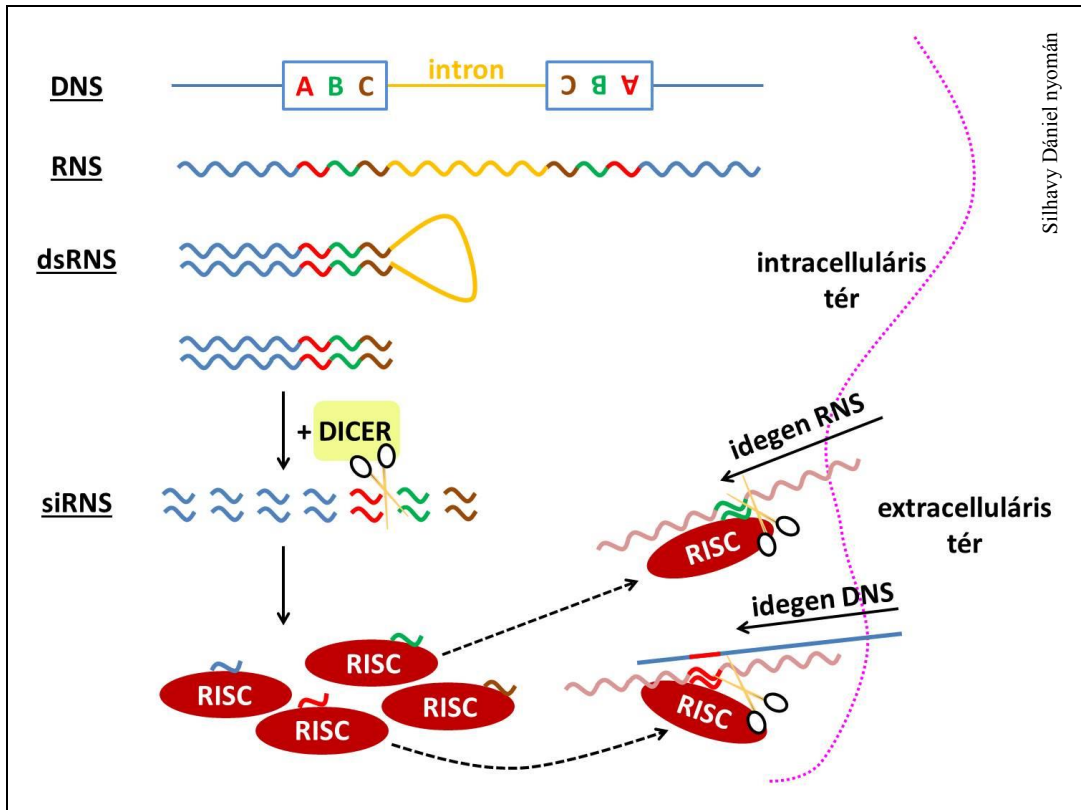
Klasszikus esetben a növénynemesítők a gazdaszervezet populációjában, vagy azzal rokon vad fajokban meglévő genetikai hátteret használják fel az ellenállóképeség kialakítására, vagy javítására. Ezt a megközelítést HDR-nek (host-derived resistance – gazda eredetű rezisztencia) nevezik. Olyan genotípusok jöhetnek szóba, amelyek egymással keresztezhetőek és fertilis utódokat képesek létrehozni. A fertőződéssel szembeni ellenállóképeség kialakításának célja a kórokozó távoltartása az egyébként fogékony növénytől. A gazda speciális morfológiai jellemzőire vezethető vissza, mint például a levelek szőrözöttsége, viaszoltsága, a kutikula vastagsága, stb. Ezekre a tulajdonságokra könnyen indítható szelekciós nemesítési program (Papp és Mesterházy, 1996), de jelentősége alárendelt, mert az ilyen típusú rezisztenciát a magasabb koncentrációban előforduló vírusok könnyen áttörnek, így tartós védelmet nem nyújt. Ezért a betegséggel szembeni rezisztencia kialakításakor inkább a kórokozó szaporodásának és a tünetek kialakulásának gátlására törekednek. Árpa génbanki tételek YDVs ellenállóképeségét már az 1950-es években szűrni kezdték az Egyesült Államokban (Kalifornia, Wisconsin, Illinois), és számos toleráns típust azonosítottak. Az eredményeket a 3H kromozómán található *Yd2* szemidomináns génnek tulajdonították (Rasmusson és Schaller, 1959). A gént hordozó változatok felkutatására szelekciós programokat indítottak az USA-n kívül Kanadában, Mexikóban és Szíriában. Húsz év alatt (1970-1990) mintegy 25, viszonylag jó szántóföldi rezisztenciával rendelkező árpafajtát sikerült azonosítani (Burnett és Mezzalama, 1990; Ranieri és mtsai, 1993). Baltenberger és mtsai (1987) leírták, hogy az *Yd2* gén a MAV és a PAV törzsekkel szemben jóval hatékonyabb, mint az RPV és RMV törzsekkel szemben – ezzel is előrevetítették a két utóbbi törzs rendszertani helyének módosítását. Niks és mtsai (2004) egy újabb, a PAV és a MAV-törzsszel szemben is hatásos génről számoltak be az árpa 6H kromozómáján, és *Ryd3*-nak nevezték el. Kiterjedt kutatásokat folytattak a zab rezisztenciájának fokozására is. Használható forrásokat találtak az *Avena sativa* L. mellett a hexaploid *A. sterilis* L.-ben és *A. fatua* L.-ban, valamint a diploid *A. strigosa* (Schreber)-ban (Rines és mtsai, 1980; Comeau, 1982). Árpához és zabhoz képest búzával kevesebb ilyen jellegű kísérletet végeztek. Az egyik elhíresült genotípus az Anza, amelyben kimutatták a részlegesen domináns *Bdv1* rezisztenciagént (Singh, 1993). Larkin és mtsai (1990), valamint Xu és mtsai (1994) számos vad fajról – *Aegilops*, *Agropyron*, *Elymus*, *Elytrigia*, *Hordeum*, *Leymus*, *Thinopyron spp.* – közölték, hogy szóba jöhetnek, mint YDVs rezisztenciaforrás. Több kutatócsoport is kimutatta, hogy az *Elymus hispidus* (szin. *Thinopyron intermedium*) 2Ai és 7Ai kromozómáján rezisztenciagéneket hordoz (Sharma és mtsai, 1995; Larkin és mtsai, 1995). Zhang és mtsai (1999) a 7Ai kromozómán található génnek a *Bdv2* nevet adták. Ausztráliában, Kínában és Mexikóban keresztezési programokat indítottak ezzel a vad fajjal és sikerült előállítani néhány ígéretes fajtát, de nagyon nehéz tette a nemesítést, hogy sok hátrányos tulajdonság is átkerült a búzába a

donor növényből (Ayala és mtsai, 2001). Mivel az Egyesült Államokban a WSMV okozta a legnagyobb termés kiesést búzában, az ezzel a vírussal szembeni ellenállóképesség kutatása került előtérbe. Rezisztenciaforrást búzában nem, csak a vele rokon fajokban találtak. Az atka vektor megtelepedése ellen két kecskebúza fajban (*Aegilops tauschii* és *A. elongatum*) írtak le ellenállóságot, a kórokozóval szemben pedig *Elymus hispidus* és *Thinopyrum ponticum* fajokból vitték át a *Wsm1* rezisztenciagént nemesítési anyagokba (Sebesta és mtsai, 1995; Friebe és mtsai, 1996; Chen és mtsai, 1998). A *Bdv2* és a *Wsm1* génekkel szorosan kapcsolt molekuláris markereket is kifejlesztettek, így hatékonyabbá vált a genotípusok szelekciója (Talbert és mtsai, 1996; Zhang és mtsai, 2004). Ennek ellenére vírusrezisztens búzafajtát hagyományos nemesítéssel nehezen, sok év alatt lehet kialakítani. Megjegyezzük, hogy Benkovics és mtsai (2010) jelentős WDV-fogékonyságbeli különbségeket írtak le köztermesztésben lévő magyar búzafajták vizsgálata során, amelyek értékesek lehetnek a nemesítés szempontjából. Sajnos igen kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a kalászos gabonafélékben előfordul-e keresztrezisztencia a különböző vírusokkal szemben. Nem mindegy ugyanis, hogy 4-5, egymástól függetlenül öröklődő tulajdonságot kell kombinálnia a nemesítőnek, vagy van olyan rezisztenciaforma, amely egyszerre több kórokozóval szemben is védelmet biztosít. A fajtaelőállítás szempontjából ez alapvető fontosságú lenne, a legtöbb publikáció azonban csak egy vírusra koncentrál.

A biotechnológia fejlődése lehetővé tette a HDR mellett a PDR-ben (pathogen derived resistance – kórokozó eredetű rezisztencia) rejlő lehetőségek kihasználását is (Lomonosoff, 1995). Mivel a genetikai kódszótár univerzális érvényű, a kórokozók génjei működtethetők növényi sejtekben is. Vírusrezisztencia témában Powell Abel és mtsai (1986) publikálták elsőként, hogy a TMV köpenyfehérjéjét dohányban expresszáltatva a mozaikos betegségre rezisztens növényeket kaptak. Sikerük nyomán számos csoport indított kísérleteket a különböző kórokozókkal szembeni ellenállóképesség kialakítására a PDR elvén. Igen sokféle megközelítést kidolgoztak a cél érdekében: kódoló és nem kódoló, átíródó és át nem íródó, teljes és csonkított, szensz és antiszensz orientációjú szekvenciákat próbáltak ki (Fuchs és Gonsalves, 2002; Heszky, 2005; Kosova és mtsai, 2008). Gabonafélékben Hayakawa és mtsai (1992) az elsők között publikáltak ilyen jellegű eredményeket. Rizsben expresszáltatták az RSV (Rice stripe *tenuivirus* – rizs csikoltság vírus) köpenyfehérje génjét, amely öt növényvonalból háromban statisztikailag igazolható rezisztenciát eredményezett. Ugyancsak köpenyfehérje gén beépítésével kísérleteztek Dong és mtsai (2002), és sikerült előállítaniuk egy a WYMV-vel (Wheat yellow mosaic *bymovirus* – búza sárga mozaik vírus) szemben erős rezisztenciát mutató búzatörzset, amely azonban levél- és magmorfológiában eltért a kiindulási genotípustól. Sivamani és mtsai (1999) az RTSV-ből (Rice tungro spherical *waikavirus* – rizs gömbölyű magvúság vírus) származó három köpenyfehérje gént juttattak be egyazon rizs genotípusba, s ennek eredményeként az inokulált növények 17-73 %-a egészséges maradt. Ez a kutatócsoport a WSMV-vel is végzett kísérleteket. Előbb a vírus N1b és köpenyfehérje génjét együttesen

építették be búzába (Sivamani és mtsai, 2000), majd csak a köpenyfehérje génjét (Sivamani és mtsai, 2002). Egyik esetben sem kaptak rezisztens növényeket, csak toleránsakat, amelyeken a tünetek később jelentkeztek, mint a nem transzformált kontrollokon. Zhang és mtsai (2001) egy bakteriális eredetű ribonukleáz génnel transzformáltak búzát, s a vizsgált 96 növényből 51 vírusmentes maradt BSMV-inokulációt követően. Pinto és mtsai (1999) rizsben expresszáltatták az RYMV (Rice yellow mottle *sobemovirus* – rizs sárga foltosság vírus) RNS-függő RNS-polimeráz enzimének génjét. Magas fokú, horizontális rezisztenciát figyeltek meg 14-ből 11 rizstörzsnél, sőt a másik háromnál is csak közepes tünetek fejlődtek ki a növényeken. Zabban és árpában is születtek biztató eredmények a BYDV replikáz-illetve köpenyfehérje génjének beépítése kapcsán (McGrath és mtsai, 1997; Koev és mtsai, 1998). A fenti példákban bemutatott gabonafélék azonban sosem kerültek kereskedelmi forgalomba, ellentétben a Hawaii-szigeteki vírusrezisztens papajával, amely a PDR igazi sikertörténeteként ismert. A papaya gyümölcse a Hawaii-szigetcsoport egyik legfontosabb exportcikke immár sok évtized óta. Termelésének központja az Oahu-sziget volt egészen az 1950-es évekig, amikor is tömeges megbetegedés kezdődött az ültetvényeken. A járványt a levéltetvekkel terjedő PRSV (Papaya ringspot *potyvirus* – papaya gyűrűs foltosság vírus) okozta. A termelési központ emiatt áttevődött a Hawaii-szigetre, s 1984-ben már 36,5 millió tonna gyümölcs termett a szigeteken. A vírus azonban ott is lesújtott, és csak kipusztult ültetvényeket lehetett látni az utak mentén egészen a 2000-es évek elejéig. Dennis Gonsalves professzor vezetésével indult kutatómunka rezisztens papayaváltozatok létrehozására az 1990-es évek elején. A vírus köpenyfehérjéjének génjével transzformálták a SunUp genotípust, majd az egyik pozitív törzs utódait keresztezték az export célokra legmegfelelőbb Kapoho Solo fajtával. Így jött létre a Rainbow fajta, ami 1998-ban kapott forgalomba hozatali engedélyt. Jelenleg Hawaii papaya exportjának 77 %-át a Rainbow teszi ki, a fennmaradó részt pedig a nem transzformált Kapoho Solo. A termelés újra eléri az évi 13 millió tonnát, a főbb felvásárlók Kanada, Japán, Hong Kong, Kína és Németország (Tripathi és mtsai, 2008).

Az utóbbi évtizedben a PDR egy speciális változata, az RNS-interferencia került előtérbe, amely nem igényli komplett gének átvitelét a kórokozóból a gazdaszervezetbe. Magát a jelenséget a *Caenorhabditis elegans* fonálféregben írták le (Fire és mtsai, 1998), amelyért Andrew Fire (Carnegie Institution for Science) és Craig Mello (University of Massachusetts) 2006-ban elnyerte az orvosi és élettani Nobel-díjat. Az RNS-interferencia az eukarióta élőlényekben működő, ősi géncsendesítési rendszer, amely magába foglalja a transzkriptek degradációját, a génexpressziót szabályozó fehérjék szintézisének gátlását, a sejt védekezési mechanizmusát a kívülről bejutó nukleinsavak – vírusok, transzpozonok vagy transzgének – ellen (Brodersen és Voinnet, 2006; Baykal és Zhang, 2010). A mechanizmus jelentőségét a legjobban alátámasztja, hogy ha a PubMed kereső mezőjébe az „RNA silencing” kombinációt írjuk, több mint 55.000 tudományos cikket találunk. A rendszer működési elvét a 3. *ábra* segítségével ismertetjük.



Silhavy Dániel nyomán

3. ábra. RNS-interferencia indukálásával kialakított vírusrezisztencia sematikus működési elve egy közönséges növényi sejtben. A nukleáz aktivitás helyeit ollókkal jelöltük. További magyarázat a szövegben. Az ábra nem méretarányos

Az RNS-interferenciát dsRNS-ek (kétszálú RNS) indukálják, amelyeket egy RNázIII-szerű nukleáz, a DICER 21-25 nukleotid méretű rövid darabokra – miRNS (mikro RNS; 21-22 nt) vagy siRNS (rövid interferáló RNS; 23-25 nt) – vág (Hamilton és mtsai, 2002; Xie és mtsai, 2004). Ezek a rövid RNS-ek csendesítő komplexekhez kapcsolódnak és az interferencia szekvencia-specifikusságát biztosítják, mivel funkciójuk a komplexek elvezetése a velük komplementer nukleinsavakhoz azok specifikus vágása végett (Baulcombe, 2004, 2005; Filipowicz és mtsai, 2005). Ha a vezető siRNS és a mRNS teljesen komplementerek egymással, akkor a RISC (RNA-induced silencing complex – RNS-indukált csendesítő komplex) ezen a helyen elvágja a mRNS-t a mRNS-siRNS struktúra közepén, így degradálja a csendesítést indukáló dsRNS-ekkel szekvenciaazonosságot mutató nukleinsavakat. Részleges komplementaritás esetén a RISC a mRNS translációját gátolja meg. Végeredményben a csendesítés célpontjának számító mRNS genetikai információtartalma nem expresszálódik. A legújabb kutatások a mechanizmus finomhangolásának tanulmányozására irányulnak (Jinek és Doudna, 2009; Siomi és Siomi, 2009; Bapat, 2013).

Az RNS-interferencia fontos antivirális szerepet játszik mind a növényekben, mind az állatokban (Ding és mtsai, 2004; Lindbo és Dougherty, 2005; Ghildiyal és Zamore, 2009). A vírusfertőzés aktiválja a sejt RNS csendesítő rendszerét, mert a növény mind az RNS vírusok replikációs intermedierjeit, mind az egyszálas DNS-vírusok átfedő szensz-antiszensz transzkriptjeit dsRNS-ként értelmezi. A DICER-szerű enzimek a virális dsRNS-eket siRNS-ekké alakítják, amelyek a RISC-hez hozzákapcsolódva a Watson-Crick-féle bázispárosodás szabályai szerint felismerik a sejtbe jutott patogén nukleinsavát, a RISC pedig degradálja azt (Ding és Voinnet, 2007; Haasnoot és mtsai, 2007). Fontos megjegyezni, hogy bár az RNS-interferencia hatékony antivirális rendszer, sok vírus mégis megfertőzi a növényeket, mert a növényvírusok RNS-csendesítést gátló fehérjéket is kódolnak (Silhavy és Burgyán, 2004; Mérai és mtsai, 2006), és mert a csendesítési rendszer csak késleltetve aktiválódik, miután a vírus replikálni kezdett.

Amennyiben egy DNS-szakasz intronnal elválasztott, fordítva ismétlődő szekvenciákat tartalmaz, az arról átíródó mRNS hajtú formát vesz fel, és dsRNS-sé alakul. Az ilyen DNS-konstrukció a célmolekula teljes csendesítését eredményezheti. Ha a fordítva ismétlődő szekvenciák virális eredetűek és konstitutív promóterrel szabályozottak, a DNS-t expresszázó növény immunissá válhat az adott kórokozóval szemben, mert a RISC még a replikáció megindulása előtt elbontja a vírus nukleinsavát (Smith és mtsai, 2000; Fusaro és mtsai, 2006). Ez a lehetőség újabb lendületet adott a vírusrezisztencia kutatásoknak, főleg miután Bucher és mtsai (2006) olyan *Nicotiana benthamiana* transzformánszt állítottak elő, amely négy tospovírussal szemben is ellenállónak bizonyult. Ez volt az első sikeres kísérlet, amely ún. multivírus rezisztencia kialakítását célozta meg. Egyszikű növényben ehhez hasonló eredményt még nem publikáltak.

Megvan tehát az elvi lehetősége annak, hogy a 2.4. fejezetben ismertetett, Magyarországon gyakran károsító gabonavírusok ellen immunis búzatörzseket hozzunk létre. A disszertáció második részében ennek gyakorlati megvalósításáról számolunk be, és az előállított búza genotípusok kórtani tesztelésének eredményeit ismertetjük.

2.6. Vírusfertőzések kimutatásának lehetőségei növényi mintákból

A növényi virológia önálló tudományággá válásának idején, azaz a 20. század első évtizedeiben a vírusfertőzések kimutatása kizárólag vizuális alapon, a tünetek felvételezésével történhetett. A gazda-parazita kapcsolatot, ezáltal a kórképeket azonban számos tényező befolyásolja, illetve a kevert fertőzések esetén a kórképek gyakran elfedik egymást vagy additívan jelentkeznek. Ezért csupán a kórtünettanra hagyatkozva nem lehet egyértelműen beazonosítani a kórokozókat.

Az elektronmikroszkóp feltalálása és diagnosztikában való alkalmazása láthatóvá tette magukat a patogéneket, így azok elkülöníthetővé váltak alakjuk, szerkezetük és összetételük alapján (Almási, 1999). Az elektronmikroszkópos vizsgálatok kombinálása a még modernebb módszerekkel lehetővé teszi a vírusok pontos

azonosítását, illetve rendszertani helyük megállapítását, rokonsági körük felderítését. Magas költségigényük miatt azonban az elektronmikroszkópos eljárások nem alkalmasak nagyszámú minta feldolgozására.

A virológiában mérföldkönek számított a szerológiai vizsgálatok sikeres bevezetése. A szerológiai reakciók alapelve az a felismerés, hogy ha egy melegvérű állat vérébe nagy molekulatömegű fajidegen anyag (pl. fehérje) kerül, akkor ez antitestek képződését indukálja az állat vérsavójában. A szakirodalom az antitest molekulákat öt immunoglobulin (Ig) osztályba sorolja: IgG, IgM, IgA, IgD és IgE. Leggyakrabban az IgG-t és IgM-et használja a szerológia. Minden antigén hatására csak a neki megfelelő antitest képződik, amely képes felismerni saját antigén párját, így létrejön az immunválasz-reakció, lehetővé téve az antigén pontos azonosítását (Kazinczi, 1999). Általában a köpenyfehérjéket használják fel antigénként növényvírusok kimutatására, de a levéltetű-átvitelért felelős helper komponensek is szóba jöhetnek. A vírus köpenyfehérjéjének azt a minimum 5-7 aminosavból álló szakaszát, amely az antitesttel kapcsolatba lép, epitópnak nevezik. Egy fehérjén több epitóp is lehet. Az antitesteken legalább kettő paratóp helyezkedik el, ezek ismerik fel az antigén epitópját. Az epitóp-paratóp kapcsolódás reverzibilis, erőssége a hőmérséklettől, a pH-tól és az oldhatósági viszonyoktól függ. A poliklonális antitestek több epitóppal szemben reaktívak, a monoklonálisak csak eggyel szemben. A növénykórtanban a monoklonális antitestek alkalmazása igen elterjedt, mivel jól alkalmazhatók a vírusok mennyiségi és minőségi meghatározására. Az ELISA-tesztet (enzyme linked immunosorbent assay – enzimhez kötött ellenanyag vizsgálat) Avrameas (1969) alkalmazta először növényvírusok kimutatására. Az antigén-antitest reakció egy az antitesthez kapcsolt enzim segítségével követhető nyomon. A reakcióelegy színváltozásának mértéke – amely fotométerrel számszerűsíthető – arányos a keresett vírus koncentrációjával. Léteznek indirekt és direkt eljárások, utóbbiak közé tartozik a DAS-ELISA (double antibody sandwich-ELISA – kettős antitest szendvics), amelyet Clark és Adams (1977) fejlesztettek ki. Specifikus, pontos és érzékeny módszer, akár fél nanogramm vírus is kimutatható vele. Gazdaságosan alkalmazható tömeges vizsgálatokhoz, ezért vált a növényvírusok diagnosztizálásában a legnépszerűbb szerológiai módszerré. A fontosabb gabonavírusok is egyszerűen kimutathatók vele (Vacke és Cibulka, 2000; Al-Ani és mtsai, 2012; Tatineni és mtsai, 2013).

A fertőzések diagnosztizálása és a vírustaxonómia is újabb lehetőséggel bővült a nukleinsav alapú *in vitro* technikák rohamos fejlődésével. Hibridizációs és amplifikációs eljárásokkal mind a DNS, mind az RNS genommal rendelkező vírusok kimutathatók és jellemezhetőek. A sikeres detektáláshoz szükséges a keresett kórokozó örökítőanyagának legalább részleges szekvenciaismerete. Nukleinsav-hibridizáció során a purin- és pirimidinbázisok komplementaritását használják ki. Nejlon- vagy nitrocellulóz-membránra blotolják a méret szerint elválasztott, denaturált nukleinsav mintákat. A filtert radioaktívan vagy kémiai jelölt próbát tartalmazó oldatban inkubálják. A próbával komplementer nukleinsavszakaszok autoradiográfiával, illetve a színreakciók elemzésével mutathatók ki. A Southern-, Northern- és dot-blot-hibridizáció általánosan alkalmazott a

növényvirologiában. Sikerrel használták számos vírus, így a BYDV és a WSMV kimutatására is (Habibi és mtsai, 1987; Sherwood, 1987).

A PCR-alapú módszerek (polymerase chain reaction – polimeráz lánreakció) jó lehetőséget adnak szekvenszificus amplifikációra, ha kis mennyiségben van jelen a kimutatni kívánt nukleinsav. Amennyiben a keresett vírus RNS-genomú, akkor elsőként reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS szintézise szükséges, amely templátként szolgál a reakció további lépéseiben – ez a módszer a reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR). DNS-vírusoknál maga a genomi DNS a reakció templátja. A templát két specifikus primerrel behatárolt, ismert bázissorrendű szakaszát hőstabil DNS-polimeráz enzim reakcióelegyhez adásával lehet megsokszorozni. Az automatizált reakció ciklikusan ismétlődik, a termékek mennyisége exponenciálisan növekszik, ezért akár pikogramm nagyságrendű kiindulási nukleinsav is elegendő az eredményhez. A felszaporított DNS-szakasz gélelektroforézissel rutinszerűen láthatóvá tehető. Magát a módszert 1983-ban fejlesztette ki a Cetus Corporation vegyész, Kary Mullis, amiért 1993-ban kémiai Nobel-díjat kapott (Mullis és Faloona, 1987). Azért terjedt el a PCR használata a vírusdiagnosztikában, mert rendkívül specifikus, a mintavételtől számított 4-6 órán belül eredményt ad és sok minta feldolgozható vele, sőt, ha sikerül optimalizálni a reakció paramétereit, akár többféle vírus is detektálható egyidőben ugyanarról a növényről származó mintából (Deb és Anderson, 2008). Érzékenysége meghaladja a szerológiai módszerekét, ami akár hátrányává is válhat, mert könnyen félrevezető következtetéseket lehet levonni a gélfoto alapján. A normál PCR ugyanis csak minőségi eredményt ad (igen/nem válasz), nem pedig mennyiségit, így a fertőzöttség mértékét még becsülni is nehéz. Továbbfejlesztett változata, a qRT-PCR (quantitative real time PCR) azonban ezt a hátrányt is kiküszöböli és a nukleinsavamplifikációt az egyik legmegbízhatóbb diagnosztikai módszerré teszi. Szinte valamennyi gabonavírus esetében sikerrel alkalmazták az eddigiekben (Malmstrom és Shu, 2004; Mumford és mtsai, 2004; Jarosova és Kundu, 2010). Az értekezés harmadik részében azt vizsgáljuk meg, hogy az előző fejezetben megfogalmazott célkitűzések (vírusrezisztencia kialakítása búzában) megvalósítása során kifejlesztett primerek alkalmasak-e szántóföldi vírusfertőzések detektálására búzában, illetve ELISA-teszttel összehasonlítva milyen hatékonysággal lehet azokat használni diagnosztikai célokra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kitűzött céljaink eléréséhez számos módszert alkalmaztunk, bizonyos technikákat több munkafolyamatban is. Ezeket a protokollokat helyszűke miatt nem ismertetjük minden egyes esetben, hanem a szövegben utalunk részletes leírásuk helyére.

3.1. Széles spektrumú gyomirtószerral szembeni rezisztencia vizsgálata

Kísérletünkben glufozinát-ammónium különböző koncentrációival kezeltünk egy olyan búzatörzset, amelybe előzőleg gyomirtószerezisztenciát eredményező DNS-szekvenciát építettek be. Célunk volt a búzatörzs ellenállóképességének részletes elemzése, valamint az extrém magas koncentrációban alkalmazott glufozinát-ammónium terméskialakító komponensekre gyakorolt komplex hatásának megismerése.

3.1.1. A vizsgált hatóanyag letális dózisának megállapítása

Viszonyítási alapként egy előkísérlet során meghatároztuk a glufozinát-ammónium letális dózisát. Vad típusú CY-45 búza (*Triticum aestivum* L.) szemterméseiből felületi sterilizálás után érett embriókat izoláltunk és *in vitro* csíráztattuk azokat üvegfiólákban, amelyek 5 ml $\frac{1}{2}$ MS₀ táptalajt (Murashige és Skoog, 1962) tartalmaztak, kiegészítve 0, 1, 2 illetve 4 mg·l⁻¹ glufozinát-ammóniummal (C₅H₁₅N₂O₄P; 198,16 g·mol⁻¹; Sigma). A csíráztatást klímakamrában (24 °C, 16 óra világos / 8 óra sötét fotoperiódus) végeztük. Az eredményeket a tenyésztés tizedik napján értékeltük ki.

3.1.2. Herbicidrezisztencia teszt

Magát a rezisztencia tesztet a „T-124” jelű búzatörzsszel végeztük el, amelyet Pauk és mtsai állítottak elő (1998) úgy, hogy a pAHC20 vektormolekulát (Christensen és Quail, 1996) részecskebelövéses módszerrel beépítették a CY-45 búzatörzsbe, amely ezáltal a kukorica eredetű *ubiquitin-ligáz* gén konstitutív promóterével ellátott *bar* gént hordozta. Vizsgálatunkat megelőzően a búzatörzs egyedeit hét generáción keresztül öntermékenyítettük, miközben a *bar* génre szelektáltunk. Az érett embriók csírázása során a szövettenyésztés körülményei megegyeztek az előző fejezetben leírtakkal. Tizennégy különböző koncentrációt alkalmazva (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 200, 400, 600, 800, 1000 és 5000 mg·l⁻¹) a táptalajokat glufozinát-ammóniummal egészítettük ki, míg a kontroll kezelés esetén a táptalaj nem tartalmazta a herbicidet. Minden fiólabába egy embriót helyeztünk és minden kezelést nyolc ismétlésben végeztünk el. Három hetes szövettenyésztési periódus

után a növénykéket talajba ültettük és zárt rendszerű üvegházban neveltük fel a 3.2.2.3. fejezetben leírtak szerint. A kalászkat egyenként arattuk le és vizuális értékelés alapján *jól termékenyült* és *rosszul termékenyült* csoportokba osztottuk. Betakarítás után megállapítottuk a növényenkénti kalászszaámot, a kalásonkénti szemszaámot és a növényenkénti termést, illetve kiszámítottuk az ezerszemtömeget. A herbicidrezisztencia teszt során felhasznált búzapopulációt illetően mindegyik kezelésnél véletlenszerűen kiválasztottunk egy egyedet a nyolc közül, amelyek leveleiből összes RNS-t izoláltunk és RT-PCR-el ellenőriztük a *bar* gén expresszióját. A molekuláris technikák módszertanát a 3.2.5. fejezetben írtuk le részletesen.

3.1.3. Statisztikai értékelés

A terméskialakító komponensek adatait a jól termékenyült és a rosszul termékenyült kalászkok csoportjában külön-külön elemeztük. A teljesen és a részlegesen steril kalászkok eredményeit nem hagytuk figyelmen kívül. A glufozinát-ammónium agronómiai paraméterekre gyakorolt hatását egytényezős varianciaanalízissel értékeltük $P = 5\%$ hibaváloszínűségi szinten Sváb (1981) útmutatása szerint.

3.1.4. Egyéb kísérleti körülmények

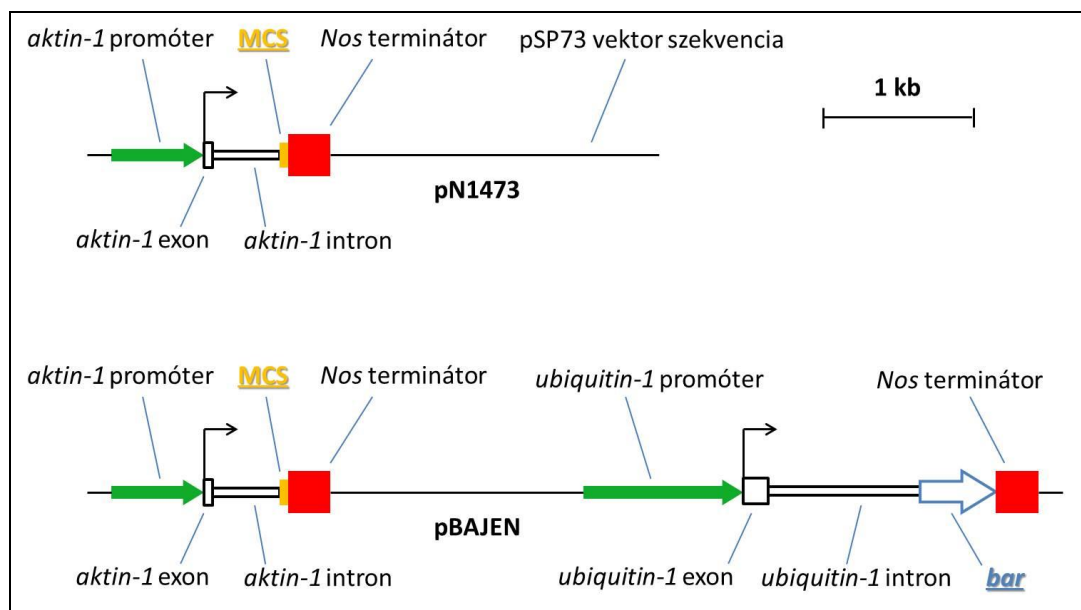
Fajidegen DNS-szekvenciákat tartalmazó búza törzsekkel kizárólag zárt rendszerben (*in vitro* növénynevelő kamrában, illetve üvegházi kabinban) végeztünk vizsgálatokat. Glufozinát-ammóniummal szemben ellenálló tenyésanyagainkat a 103613/4/2006 számú Engedélyező Határozatban leírtak szerint kezeltük. A megfigyelések és a kísérlet kiértékelése után a növényanyagot a NÉBIH szakembereinek jelenlétében és előírásuk alapján megsemmisítettük. Erről 162/1/210 szám alatt jegyzőkönyv készült, amit az engedély alapján szerkesztettünk és a hatóságnak bemutattunk.

3.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata

Ebben a kísérletsorozatban gabonavírusokkal szemben rezisztenciát eredményező nukleinsav szekvenciákat és ezek kombinációit kívántuk expresszáltatni búzában. További célunk volt megismerni, hogy hatékonyan felhasználható-e az RNS-interferencia a vírusfertőzések leküzdésére.

3.2.1. Transzformációs vektormolekulák

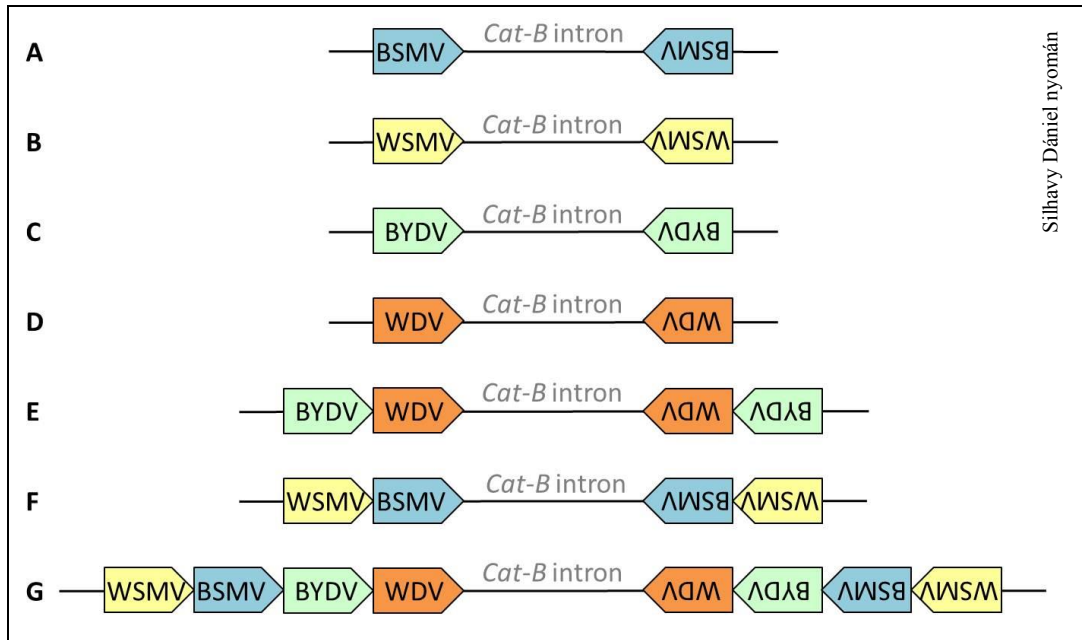
Munkánk során az Ahlandsberg és mtsai. (2001) által kifejlesztett pBAJEN vektort alkalmaztuk. Az alapplazmid a 2464 bp méretű pSP73 vektorból (Promega) származott, amelybe egy 28 nukleotid hosszú multi klónozó helyet (MCS) építettek be a következő enzimek hasítóhelyeivel: *Bcl*II, *Bsp*EI, *Bln*I/*Avr*II és *Asc*I. A MCS elé rizs eredetű, konstitutívan működő *aktin-1* promótert, mögé *Nos* terminátor szekvenciát ligáltak. A rizs *aktin-1* génjének első exonja és első intronja a génexpresszió fokozása érdekében benne maradt a konstrukcióban, ezáltal létrejött a pN1473 vektor. A kukorica eredetű *ubiquitin-1* promóterrel és szintén *Nos* terminátorral szabályozott *bar* gént a pAHC20 plazmidból emelték át a pN1473 vektorba (*Act-1* – MCS – *Nos* és *Ubi-1* – *bar* – *Nos* konstrukciók azonos orientációban), így kapták a pBAJEN plazmidot (4. ábra).



4. ábra. A pBAJEN transzformációs vektormolekula vázlatos felépítése. Ahlandsberg és mtsai (2001) publikációja nyomán

A pBAJEN vektor nyolc változatát kaptuk meg a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont RNS-biológia csoportjától. Az első egy tesztelő vektor volt, amelynek multi klónozó helyére a *gus* riportergént ligáltak gödöllői partereink. A másik hét vektormolekulában a klónozó helyre a búza katepszin-B génjéből származó intronnal összekapcsolt, fordítva ismétlődő DNS-szekvenciákat építettek, amelyek a Magyarországon előforduló négy legjelentősebb gabonavírussal szemben biztosíthatnak rezisztenciát a vektort expresszáló növények számára. E patogén eredetű szekvenciákat úgy állították elő, hogy a kórokozók néhány

izolátumának részleges genomszekvenálása alapján klónozták azok legkonzervatívabb nukleinsav-régióit. A plazmidokat a könnyebb követhetőség miatt betűkkel jelöltük (5. ábra). Közülük négy csak az egyik vírusnak megfelelő szekvenciákat hordozta (A: BSMV; B: WSMV; C: BYDV; D: WDV), két másik egyszerre kettő kórokozó ellen lehet hatékony (E: BYDV + WDV; F: WSMV + BSMV), míg a G-jelű komplex módon mind a négy vírussal szemben védelmet adhat.



Silhavy Dániel nyomán

5. ábra. A projekt során alkalmazott transzformációs vektormolekulák. *Cat-B*: búza katepszin-B génből származó intron. Az ábra nem méretarányos

3.2.2. Búza szövettenyésztés és növényregeneráció

3.2.2.1. Növényanyag

A transzformációs munkafázis során folyamatosan biztosítanunk kellett a donor növényeket, hogy éretlen embriókhoz jussunk. Nyár elején tenyészkertről gyűjtöttünk be alapanyagot, egyébként pedig üvegházból. Kísérletünkben főleg a CY-45 genotípust alkalmaztuk, de előfordult, hogy az izolálás idején ez nem megfelelő fenofázisban állt csak rendelkezésre. Ilyenkor GK Tavasz genotípussal helyettesítettük a CY-45-öt (mindkettő CYMMIT-eredetű közönséges búza). A kallusok növekedési intenzitása, valamint a sejtek embrió- és organogenezise tekintetében ezek a genotípusok bizonyultak a legalkalmasabbnak *in vitro* szövettenyésztésre (Felföldi és Purnhauser, 1992).

3.2.2.2. *In vitro* körülmények

A szövettenyésztés sikerét nemcsak a genotípus befolyásolja, hanem az izoláláskori növénykondíció és fenofázis, vagy a különböző táptalajokra történő passzálások időzítése. Ezért fontosnak tartottuk a növény-sejt-növény rendszer működésének és a zöld növény kihozatal hatékonyságának folyamatos monitorozását. A kalluszindukcióhoz használt éretlen búzaszemeket a virágzás utáni 12-14. napon gyűjtöttük be. Felületi fertőtlenítést követően a szemtermések embrióit D₂ táptalajra izoláltuk – Petri-csészénként 50 db embrióit. Ezután a növényi anyagot ugyanazokra a táptalajokra és ugyanolyan gyakorisággal passzáltuk, ahogyan azt a genetikai transzformáció során terveztük végrehajtani. A kísérleti ciklust az 5. táblázat mutatja be.

5. táblázat. A szövettenyésztési ciklus periódusai

	T á p t a l a j o k					
	D ₂	D ₂ m	D ₂ MCu	D ₀ Cu	D ₀	½MS ₀
időtartam	6 nap	24 óra	10 nap	14 nap	14 nap	14 nap
hőmérséklet	24 °C	24 °C	24 °C	24 °C	24 °C	24 °C
megvilágítás	0 v / 24 s	0 v / 24 s	16 v / 8 s	16 v / 8 s	16 v / 8 s	16 v / 8 s

v = világos (óra); *s* = sötét (óra)

Az ismertetett tápközegeket Mihály (2009) doktori disszertációjából vettük át. Általános összetevőik a következők voltak: makro- és mikroelemek, valamint vitaminok a Duchefa Biochemie „M0221” és „M0222” néven forgalmazott por állagú táptalajaiból, ezeken kívül Na₂EDTA, szerves komponensek, hormonok, szénhidrát és szilárdító anyag. Részletes összetételük a 6. táblázatban tekinthető meg. Kémhatásukat 1M KOH és 1M HCl oldatokkal egységesen pH=5.8 értékre állítottuk be.

3.2.2.3. Növénynevelés üvegházban és klímakamrában

Az *in vitro* regenerált növénykéket általános virágfölddel töltött tápkockába ültettük ki és 3 napig átlátszó fóliával takartuk le, hogy elősegítsük megeredésüket. A megerősödött növénykéket 2 hét elteltével klímakamrába telepítettük át (4 °C, 16 óra világos / 8 óra sötét), ahol 6 hetet töltöttek el. Ezt követően átpalántáltuk őket literes tenyészedényekbe, minden cserépbe egy-egy növényt. A növénynevelés során három alkalommal 5-5 g Volldünger Linz Classic műtrágyát adagoltunk cserépenként (N:P:K=14:7:21 + MgO, B, Cu, Mn, Fe és Zn mikroelemek), illetve

szükség szerint inszekticidekkel és fungicidekkel védekeztünk az üvegházi kártevők és kórokozók ellen. Gyomirtás kizárólag kézzel történt. Olyan esetekben, amikor nem *in vitro* fázis előzte meg az üvegházi növénynevelést, a magokat tápkockába vetettük. A többi lépés a fent leírtakkal megegyezett.

6. táblázat. A szövettenyésztés és a növényregeneráció során alkalmazott táptalajok részletes összetétele ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

Komponensek	T á p t a l a j o k					
	D ₂	D _{2m}	D ₂ MCu	D ₀ Cu	D ₀	½MS ₀
KNO ₃	1900	1900	1900	1900	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1650	1650	825
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	440	440	440	440	220
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	370	370	370	370	185
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170	85
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,415
H ₂ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	3,1
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	11,15
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	5,25
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85	13,925
Na ₂ EDTA	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25	18,125
Myo-inozitol	100	100	100	100	100	50
Nikotinsav	–	–	–	–	–	0,25
Piridoxin-HCl	–	–	–	–	–	0,25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	–	–	2,5	2,5	–	–
Thiamin-HCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
2,4-D	2	2	2	–	–	–
Mannitol	–	63700	–	–	–	–
Glicin	–	–	–	–	–	1
Szacharóz	30000	30000	–	30000	30000	–
Maltóz	–	–	30000	–	–	–
Gelrite	2800	2800	2800	2800	2800	2800

3.2.3. DNS-szekvenciák bejuttatása búza sejtekbe

A növényanyagot a 3.2.2. fejezetben leírtak szerint készítettük elő a genetikai transzformációhoz. A D₂ táptalajon dedifferenciálódott kalluszokat 4 órával a géntranszfer előtt mannitollal kiegészített D_{2m} táptalajra raktuk át, s az így indukált ozmózis a sejtfalak fellazítása révén elősegítette a vektormolekulák célba érését. A transzformációs plazmidokat BioRad PDS1000/He részecskebelövő készülékkel juttattuk be a célsejtekbe a következők szerint:

1. Elsőként 60 mg (20-25 lövéshez elegendő) arany szemcsét (átmérő: 1 μm ; BioRad) mértünk be 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, 1 ml abszolút etanolt adtunk hozzá és 3 percig kevertük Vortexszel, majd 14000-es fordulaton 2 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után újabb 1 ml abszolút etanolt adtunk az arany szemcsékhez és a folyamatot megismételtük. Végül szintén 1 ml abszolút etanolt mértünk be az Eppendorf csőbe.
2. Az így előkészített arany szuszpenziót $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig, illetve az napi használat esetén jégre tettük.
3. Közvetlenül felhasználás előtt a leülepedett szuszpenziót 3 percig kevertük Vortexszel, majd az egyenletesebb eloszlás érdekében ultrahangos vízfürdőbe mártottuk. A továbbiakban végig jégen dolgoztunk.
4. Bemértünk 30 μl arany szuszpenziót 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk.
5. Hozzáadtunk 50 μl steril vizet (Millipore), Vortex és ultrahangos vízfürdő segítségével szuszpendáltuk, 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk.
6. Bemértünk 55 μl steril vizet és megismételtük az előző lépést.
7. Hozzáadtunk 5 μl -nyi, $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ koncentrációjú plazmid DNS-t és 1 percig kevertük Vortexszel. Hozzáadtunk 20 μl frissen felolvasztott 0,1M spermidint és 50 μl CaCl_2 -ot. Keverés után 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk.
8. Hozzáadtunk 200 μl abszolút etanolt, az előző lépés szerint centrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk. Végül 84 μl abszolút etanolt mértünk rá az arany szemcsékre, amelyek immár felületükön hordozták a plazmid DNS-t.
9. A fentiek szerint előkészített arany szuszpenzióból 3,5 μl -t pipettáztunk az ún. makro hordozókorongokra (BioRad) és egyenletesen eloszlattuk a korongok közepén.
10. Száradás után azonnal elvégeztük a részecskebelövéses transzformációt. A készülék paramétereit a pBAJEN-*gus* konstrukcióval végzett előzetes kísérlet alapján állítottuk be. A *gus* riportergén működésének következtében kialakuló tranziens expressziós mintázatot Rasco-Gaunt és Barcelo (1999) leírása szerint detektáltuk.

3.2.4. Markergénre alapozott szelekció

A transzformált növényi szöveteket további 20 óráig ozmotikus D_2m táptalajon tartottuk, majd az 5. táblázat szerinti passzálassal indukáltuk a növényregenerációt. Mivel a munka során alkalmazott valamennyi plazmidmolekula tartalmazta a konstitutív promóterrel szabályozott *bar* gént, a pozitív variánsokat glufozinát-ammonium alkalmazásával szelektáltuk ki. A szűrést már kallusz szinten elkezdtük, a herbicidet emelkedő koncentrációban a regenerációs táptalajokba mértük a következők szerint: $\text{D}_0\text{Cu}+5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $\text{D}_0+10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $\frac{1}{2}\text{MS}_0+20\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$

glufozinát-ammónium. A szelekció utolsó lépése a növénynevelés üvegházi fázisában történt, amikor Finale 14 SL herbicid (IUPAC név: *methyl(E)-methoximino-[(E)-a-[1-(a,a,a-trifluoro-m-tolyl)ethylidene-aminoxy]-o-tolyl]-acetate*; hatóanyag: 150 g·l⁻¹ glufozinát-ammónium) 1,0 v/v %-os oldatával permeteztük le a 4-5 leveles növényeket a gyártó útmutatása szerint. A *bar* markergént molekuláris módszerekkel is kimutattuk, ezt a következő fejezet ismerteti. A szelekciót túlélő T₀ növényeket felneveltük és termésüket betakarítottuk.

3.2.5. Transz-szekvenciák kimutatása növényi mintákból

3.2.5.1. Genomi DNS izolálás

A bejuttatott DNS-szekvenciák integrálódásának vizsgálatához genomi DNS-t izoláltunk a növények leveleiből. Körülbelül 30 mg tömegű levéllemez Eppendorf csőbe helyeztünk, azt azonnal folyékony nitrogénbe mártottuk, majd további felhasználásig -80 °C-os fagyaszóban tároltuk. A genomi DNS izolálásához a Promega „Maxwell™ 16 Instrument” félautomata DNS-tisztító gépét és a hozzá gyártott „Maxwell™ 16 DNA Purification Kit”-et alkalmaztuk. Speciális üvegbotok segítségével az Eppendorf csőben eldörzsöltük a fagyott levéldarabkákat. A kit használati utasítását követve 600 µl lízispuffert mértünk rá az eldörzsölt mintákra, majd a szuszpenziót vágott hegyű pipettával bemértük a kit első cellájába. A kitben található elúciós csövekbe 200 µl elúciós puffert mértünk be. A gép segítségével egyidejűleg 16 mintát tudunk feldolgozni. A program lefuttatása után a párolgási veszteség miatt körülbelül 150 µl-nyi, DNS-t tartalmazó oldat maradt az elúciós csövekben, amelyet nukleázmentes Eppendorf csövekbe pipettáztunk át és 4 °C-os hűtőben tároltuk további felhasználásig.

3.2.5.2. Összes RNS izolálás

A bejuttatott DNS-szekvenciák expressziójának vizsgálatához összes RNS-t izoláltunk a növények leveleiből a Promega által forgalmazott #Z3100 jelű kit alkalmazásával. A levélminták eldörzsöléséig ugyanúgy jártunk el, amint azt a genomi DNS izolálásánál ismertettük. A munkához szükséges egyszer használatos eszközöket mindig frissen sterilizáltuk, az oldatokat és az Eppendorf csöveket pedig végig jégen tartottuk. Az egyszerre kezelhető mintamennyiséget a rendelkezésre álló centrifugarotor határozta be – esetünkben ez 24 férőhelyes volt. A folyamat során a 2. melléklet szerinti protokollt követtük.

3.2.5.3. A transz-szekvenciák kimutatásához szükséges primerek

A búzába beépített transz-szekvenciák nyomonkövetéséhez a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontból 9 forward és 11 reverse primer törzsoladatát kaptuk meg, amelyek bázissorrendjét a 7. táblázatban közöljük.

7. táblázat. Polimeráz lánreakciókhoz felhasznált primerek szekvenciái

	Primer neve	Primer bázissorrendje (5'→3')
Forward primerek	4xIR ell2 for	GCAAGGGAAGAGGAGGGGCAAA
	Bar5 for	CGAGACAAGCACGGTCAACTTC
	BSMV Bb156 for	GCCGATCAGACTCCATTGTCCG
	PAV Sal2B for	ACGTGGATCCCAACCCAATCGAGCAGGAC
	PAV Sal2S for	ACGTACTAGTCAACCCAATCGAGCAGGACC
	TaUbi306 for	AGCGAGAAAAGTCAGCCGACCCA
	WDV B for	ATTAGGATCCGCTACCACGCACTTCCTTAT
	WDV S for	ATTAAGTAGTGCTACCACGCACTTCCTTAT
	WSMV 1000 for	CCAACCGCGTGCGGAATCATCG
Reverse primerek	4xIR ell2 rev	CGGTGTCGAGTTCAATAAAGATAGCG
	Bar6 rev	AAACCCACGTCATGCCAGTTC
	BSMV Bb1178 rev	CACTGTGTCCCTTCCACCCTTTG
	Nos-T 2028 rev	TCGCAAGACCGGCAACAGGA
	PAV Sal2S rev	ATACACTAGTCCGTCATTAAACTGACACTCATCG
	PAV-WDV átf. rev	TAAGGAAGTGCGTGGTAGCGCGGTGTCGAGTTCAATA
	TaUbi664 rev	GCCCAGCGGAGAAGATTGCC
	WDV 300S rev	GTCACTAGTCTGCTAATGCAATGTGTC
	WDV S rev	ATATACTAGTGACGGATAGACCATTCAAACG
	WSMV 1565 rev	CTGCGTCTGACGTGAGTTGTCC
	WSMV E rev	TCAGAATTCGTAGCGTCGCCCTAACCCACACA

3.2.5.4. Polimeráz lánreakciók

Spektrofotométerrel meghatároztuk az izolált genomi DNS-ek és összes RNS-ek koncentrációját, majd nukleázmentes vízzel egyformára állítottuk be. A kihígított nukleinsavakat templátként felhasználva PCR reakciókat futtattunk le a beépített transz-szekvenciák kimutatása végett. A reakcióelegy összemérése alatt végig jégen dolgoztunk. Minden mintát leteszteltünk az *ubiquitin-ligáz* génre tervezett TaUbi306 for + TaUbi664 rev primerpárral, amely arról adott információt, hogy alkalmasak-e amplifikációra a minták. A transz-szekvenciák integrálódásának vizsgálatához genomi DNS templátot és hagyományos PCR-t alkalmaztunk, míg az expresszió ellenőrzését összes RNS templáttal és egy lépéses RT-PCR-rel végeztük. Az RT-PCR-hez a Qiagen „One Step RT-PCR Kit” oldatait használtuk fel és Fermentas „RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor” bemérésével védtük az RNS-eket a degradációtól. A reakcióelegyek térfogatát 20 µl-re állítottuk be (8. táblázat).

Pozitív kontrollként a 3.2.1. fejezetben ismertetett plazmidokat alkalmaztuk, míg a negatív kontrollnál desztillált vízzel helyettesítettük a templátot. A 9. és 10. táblázatokban részletesen ismertetjük a reakciók programozását és a felszaporított fragmentek várható hosszát.

8. táblázat. A reakcióelegy összetétele hagyományos és RT-PCR esetén

hagyományos PCR (1 mintára)		RT-PCR (1 mintára)	
nukleázmentes víz	7,0 µl	nukleázmentes víz	11,3 µl
2x PCR Master Mix	10,0 µl	5x puffer	4,0 µl
10 µM forward primer	1,0 µl	dNTP	1,0 µl
10 µM reverse primer	1,0 µl	10 µM forward primer	1,0 µl
templát (genomi DNS)	1,0 µl	10 µM reverse primer	1,0 µl
		40 U·µl ⁻¹ RNáz inhibitor	0,2 µl
		enzim mix	0,5 µl
		templát (összes RNS)	1,0 µl
összesen	20,0 µl	összesen	20,0 µl

9. táblázat. A reakció programozása hagyományos és RT-PCR esetén

hagyományos PCR			RT-PCR		
	95 °C	180 sec	cDNS-szintézis	50 °C	1800 sec
denaturáció	94 °C	15 sec		95 °C	900 sec
annealing	változó	változó	denaturáció	94 °C	15 sec
extenzió	72 °C	60 sec	annealing	változó	változó
	72 °C	300 sec	extenzió	72 °C	60 sec
	4 °C	∞		72 °C	300 sec
				4 °C	∞

3.2.5.5. Nukleinsavak detektálása gélelektroforézissel

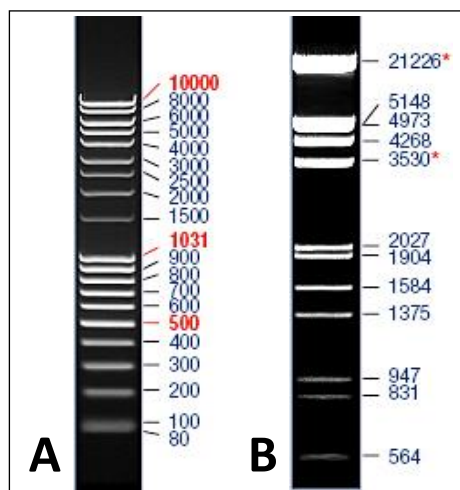
A genomi DNS-ek és a PCR termékek futtatásához 1× TAE puffert (2M tris-acetát, 0,02M EDTA, pH=8,3; Lonza) alkalmaztunk. Az agaróz alapú, 1 %-os gél készítéséhez ugyanezt a puffert használtuk. Az összes RNS-ek futtatásához frissen sterilizált 0,5× TBE puffert (0,89M tris-borát, 0,05M EDTA, pH=8,3; Lonza) alkalmaztunk. A szintén agaróz alapú, 1,2 %-os gél készítéséhez ugyanezt a puffert használtuk. Forralás után kiöntöttük a gélt és ml-enként 500 ng ethidium-bromidot adtunk hozzá. A DNS-eket és PCR-termékeket 6× Loading Dye festékkel kevertük (DNS:LD = 1:5), mielőtt felvittük azokat a géltre. Az RNS-eket közvetlenül az elektroforézis előtt denaturáltuk FDE festékkel (RNS:FDE = 1:1) 65 °C-on 5 percig, majd azonnal jégre tettük és onnan vittük géltre. A DNS-eket 40-60 percig

futtattuk 90 V feszültség mellett, az RNS-eket pedig 90 percig 70 V feszültség mellett. Végül a gélt UV-fény alatt lefényképeztük. A PCR termékek méretének meghatározásához kétféle markert (Fermentas) alkalmaztunk (6. ábra).

10. táblázat. Az ún. annealing lépés paramétereit és a várható fragmenthosszok alakulása az egyes primerpárok esetén

Primerpár	Hőmérséklet	Időtartam	Fragment
TaUbi306 for + TaUbi664 rev	68 °C	45 sec	1200 bp*
Bar5 for + Bar6 rev	62 °C	30 sec	375 bp
BSMV Bb156 for + BSMV Bb1178 rev	62 °C	45 sec	1022 bp
BSMV Bb156 for + Nos-T 2028 rev			1593 bp
PAV Sal2S for + PAV Sal2S rev			514 bp
PAV Sal2B for + Nos-T 2028 rev			605 bp
WDV S for + WDV S rev			913 bp
WDV B for + Nos-T 2028 rev			1016 bp
WSMV 1000 for + WSMV 1565 rev			563 bp
WSMV 1000 for + Nos-T 2028 rev			931 bp
BSMV Bb156 for + WSMV E rev			513 bp
WSMV E rev + Nos-T 2028 rev			776 bp
PAV Sal2S for + Nos-T 2028 rev			1512 bp
PAV-WDV átf. rev + Nos-T 2028 rev			1109 bp
BSMV Bb156 for + WDV 300S rev	56 °C	45 sec	1138 bp
4xIR ell2 for + 4xIR ell2 rev	58 °C	45 sec	254 bp

* A fragmenten belül egy 842 bp hosszúságú intron található, ezért RT-PCR esetén a várt fragment hossza csak 358 bp.



6. ábra. PCR-termékek méretének meghatározásához alkalmazott markerek.

A: MR-DNS – „Mass Ruler™ DNA Ladder Mix” 1 %-os agaróz gélen, 45 perc futtatás után (forrás: *http 10*).

B: λ-DNS – „Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker” 1 %-os agaróz gélen, 45 perc futtatás után (forrás: *http 11*).

A számok bp-ban adják meg a fragmentek hosszát.

3.2.6. Homozigóta búzapopulációk létrehozása portoktenyésztéssel

Haploid technikát alkalmaztunk annak érdekében, hogy a kísérleti növényanyag minél előbb homozigóta formában tartalmazza a bejuttatott szekvenciákat. A biztonság érdekében minden búzatörzs esetében vetőmagtartalékot képeztünk, ezért a növények termésmennyisége alapján döntöttük el, hogy melyik diploid generáció egyedeiből indítsuk a haploid programot. Üvegházban vetettük el a búzmagokat, a további növénynevelést pedig a 3.2.2.3. fejezetben leírtak szerint végeztük. Mivel a donor generáció a bejuttatott szekvenciákra nézve genetikailag még hasadt, a transzformáns dihaploid (TDH) növények előállításánál során több alkalommal is alkalmaztuk a *bar* markergénre alapozott szelekciót. A donor diploid növényeket 3-4 leveles fenofázisban Finale 14 SL herbiciddel permeteztük le, s a portoktenyésztést kizárólag a kezelést túlélő egyedekből indítottuk. A folyamatot az alábbi lépések szerint hajtottuk végre:

1. A hajtásokat akkor gyűjtöttük be, amikor a donor kalászok hasban voltak. Csapvizet tartalmazó edénybe állítottuk őket és a magas páratartalom megőrzése végett nejlonzacskóval fedtük be, majd sötét klímakamrában tartottuk őket 4 °C-on, 2 hétig.
2. A hajtásokból kiszabadítottuk a kalászokat és felületi fertőtlenítés után W14_f kalluszindukciós tápoldatra (11. táblázat) izoláltuk a portokokat. A Petri-csészéket 32 °C-os, sötét termosztátban tároltuk 80 %-os páratartalom mellett 3 napig.
3. A tenyészeteket 28 °C-os, sötét termosztátba helyeztük át és a 80 %-os páratartalom megtartása mellett 5-6 hétig inkubáltuk.
4. Amikor a pollenekből kialakuló embriószerű kallusz struktúrák mérete elérte az 1-1,5 mm-t, átraktuk azokat szilárd állagú 190-2Cu regenerációs táptalajra (11. táblázat), s a Petri-csészéket tenyésztőszobába (24 °C, 16 óra világos, 8 óra sötét fotoperiódus) helyeztük.
5. Egy hét elteltével a gyökeret és zöld hajtást fejlesztett struktúrákat üvegfialákba raktuk át, amelyekbe előzőleg bemértünk 5 ml, 20 mg·l⁻¹ glufozinát-ammóniummal szelektívvé tett 190-2Cu táptalajt. A fiolákat további 4-5 hétig tenyésztőszobába helyeztük az előző pont szerint.
6. A legalább 10 cm-es hajtást és erős gyökeret fejlesztett növénykéket tenyészedenyekbe ültettük át és üvegházban neveltük fel.

A 3-4 leveles fejlettségű növényeket lepermeteztük Finale 14 SL herbiciddel. A túlélő egyedeket tovább neveltük, majd vizuális minősítéssel kiválogattuk közülük az életerős szemterméseket nevelő, spontán dihaploid egyedeket. A haploidok rediploidizálásától eltekintettünk, ezeket a növényeket kidobtuk. Viaszerés fenofázisban minden törzsből kiválasztottuk a legtöbb termést ígérő növényeket (2-8 egyed), amelyekről levélmintákat gyűjtöttünk és a bejuttatott virális eredetű nukleinsav-szekvenciák expresszióját újra leellenőriztük RT-PCR-rel.

11. táblázat. Portoktenyésztéshez használt tápközegek összetétele ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

Komponensek	T á p k ö z e g e k		Komponensek	T á p k ö z e g e k	
	W14 _f	190-2Cu		W14 _f	190-2Cu
KNO ₃	2000	1000	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	–
NH ₄ H ₂ PO ₄	380	–	Na ₂ EDTA	37,3	37,3
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200	200	FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8
CaCl ₂ x 2H ₂ O	140	–	Nikotinsav	0,05	0,5
K ₂ SO ₄	700	–	Piridoxin-HCl	0,05	0,5
KH ₂ PO ₄	–	300	Tiamin-HCl	2	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	200	Myo-inozitol	–	100
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	–	100	2,4-D	2	–
KCl	–	40	Kinetin	0,5	0,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3	3	NAA	–	0,5
KI	0,5	0,5	Glicin	–	2
MnSO ₄ x 4H ₂ O	8	8	Maltóz	80000	–
H ₃ BO ₃	3	3	Szacharóz	–	30000
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,005	–	Gelrite	–	2800
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,5	Ficoll	100000	–
			pH	5.8	5.8

3.2.7. BSMV-fertőzéssel szembeni rezisztencia tesztelése

A molekuláris tesztek során pozitív TDH búzatörzsek vetőmagját felszaporítottuk, és a G-plazmidot (négyféle vírustól származó szekvenciákat) expeszáló növények ellenállóképességét mesterséges BSMV-fertőzéssel vizsgáltuk meg. Azt használtuk ki, hogy a BSMV mechanikai úton átvihető egyik növényről a másikra. A fertőzési forrást a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközponton keresztül Braunschweigből kaptuk, ahol a vírust árpán tartották fent. Kísérletünkhöz Salamon Pál tanácsait és személyes segítségét vettük igénybe.

3.2.7.1. A vírusátvitel hatékonyságának ellenőrzése

Előzetes vizsgálatot végeztünk egy igen fogékony árpafajta, a Lilla, illetve a vad típusú CY-45 és GK Tavasz búzák kísérletbe vonásával. A fertőzési forrásként használt árpanövény erős kórképeket mutató fiatal hajtásaiból 500 mg-ot feldaraboltunk, majd jégen hűtött dörzsmozsárban 10 mg száraz karborundum és 1 ml 0,1M Na₂HPO₄-puffer (pH=7.2) hozzáadásával eldörzsoztunk. A mesterséges vírusfertőzést zárt üvegházi kabinban végeztük el. Genotípusonként nyolc szemet vetettünk és a csiranövények felét 10 napos korban, egyleveles fenofázisban megfertőztük BSMV-vel. A fentiek szerint frissen elkészített, vírusokat tartalmazó emulziót a munkafolyamat során végig jégen tartottuk. Steril, vágott végű

pipettahegyeket használva felsértettük a búzalevelek epidermiszét és növényenként 10 µl emulziót injektáltunk a keletkezett seb felületére, amit azután púdermentes gumikesztyűt viselve ujjbeggyel bedörzsöltünk a levéllemezbe. A fertőzés után csapvizet permeteztünk a növényekre, elősegítve ezzel a turgor visszanyerését. A csíranövények másik fele az ún. mock inokulált kontrollt adta. Ezeket a növényeket vírusmentes árpából származó, ugyanakkor a fentiekkel azonos módon előkészített emulzióval inokuláltuk. A vírusátvitel hatékonyságát három hét elteltével értékeltük ki úgy, hogy az inokulált levél feletti második lombleveleken megjelenő tüneteket egy 1-től 5-ig terjedő skálán pontoztuk (1 = tünetmentes; 2 = gyengén tünetes; 3 = közepesen tünetes; 4 = erősen tünetes; 5 = igen erősen tünetes levél). A növényeket magfogásig neveltük, megfigyeltük növekedési erélyüket, generatív szerveik alakulását, termésképzésüket.

3.2.7.2. Vírusrezisztencia teszt

Magát a rezisztencia tesztet a következő TDH búzatörzsekkel végeztük el: 243-1, 243-3, 243-4 (GK Tavasz eredetűek), illetve 249-3, 249-4, 249-8 (CY-45 eredetűek). Fogékony kontrollként a vad típusú GK Tavasz és CY-45 genotípusokat használtuk. Törzsenként 20 szemet vetettünk el. E kísérlet során annyiban eltértünk a 3.2.2.3. fejezetben leírt növénynevelési módszertől, hogy a magokat nem tápkockába, hanem közvetlenül tenyészedénybe vetettük (cserepenként négyet), így a későbbi átpalántálás okozta stressztől megóvtuk a növényeket. Az inokulációt ugyanúgy hajtottuk végre, amint azt az előző fejezetben ismertettük. Mindegyik búzatörzs esetében kijelöltünk 4-4 egyedet, amelyeket vírusmentes árpából származó, de a fentiekkel azonos módon előkészített emulzióval kezeltünk (mock inokulált kontroll). Két nappal a fertőzés után 6 hétre 4 °C-os klímakabinba helyeztük a kísérleti búzapopulációt.

A növénynevelés időszakában több vizsgálatot is végeztünk. A vetéstől számított 12-18. héten hetente felvételeztük az inokulált levél feletti negyedik lombleveleken észlelt tüneteket az előző fejezetben leírt módon, valamint a kora délelőtti órákban mértük ugyanezen lomblevelek klorofilltartalmát Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502 típusú műszerrel. A készülék a vörös fény transzmisszióját méri 650 nm hullámhosszon, az infravörös fény transzmisszióját pedig 940 nm hullámhosszon. Az adatok alapján kiszámítja az ún. SPAD (Soil Plant Analysis Development) értéket, amely a klorofill tartalommal jól korreláló, mértékegység nélküli mutató. Markwell és mtsai (1995) szerint a készülék a következő képlet szerint számol: $M = \lg[(I_{940}/I_{650}) / (I_{650}/I_{650})]$; ahol I_{650} és I_{940} a kibocsátott vörös és infravörös fénynyalábok által kiváltott értékek, míg I_{650} és I_{940} a levéllemezen átengedett vörös és infravörös fénynyalábok által kiváltott értékek. Mivel genotípusonként 4 mock inokulált és 16 vírussal inokulált növény vett részt a kísérletben, a pontos statisztikai kiértékelés érdekében minden héten egymás után négyszer mértük meg a mock inokulált, egyszer pedig a vírussal inokulált növények SPAD értékét. Így genotípusonként 16-16 adatot kaptunk, amelyeket átlagoltuk.

A vetéstől számított 18. héten véletlenszerűen kiválasztottunk 4 BSMV-vel inokulált és 1 mock inokulált növényt genotípusonként, és a fentiek szerint elemzett lomblevelekből mintát vettünk szerológiai vizsgálat elvégzéséhez. Levelt gyűjtöttünk a fertőzési forrásként használt árpanövényről is, ezt tekintettük pozitív kontrollnak. A mintákat lefotóztuk, majd DAS-ELISA módszerrel határoztuk meg azok víruskoncentrációját a Pannon Egyetem Georgikon Karának keszthelyi laboratóriumában a Loewe Biochemica #07004 számú kitjének protokollját követve (3. melléklet). A folyamat végén a reakcielegyet a sárga szín megjelenéséig állni hagytuk, mialatt végbementek az enzimatikus reakciók: az alkalikus foszfatáz enzim lehasította a para-nitro-fenil-foszfát molekulákról a foszfátcsoportokat, amelynek eredményeként sárga színű para-nitrofenol keletkezett. A színváltozás erőssége közvetve a levelek BSMV-koncentrációjával arányos. A szubsztrát abszorbanciát, vagyis a színváltozás mértékét Labsystems Multiscan ELISA olvasóval 405 nm hullámhosszon értékeltük. Ha egy minta extinkciós értéke a kitben található negatív kontroll értékének a háromszorosát, azaz a 0,7-es határértéket meghaladta, akkor tekintettük a mintát a vírusra nézve pozitívnak. A növényeket magfogatásig neveltük, megfigyeltük növekedési erélyüket, generatív szerveik alakulását, termésképzésüket, magasságukat (a főhajtás föld feletti szára a kalász csúcsáig – ide nem értve a toklászszálkát). Mindet egyedileg takarítottuk be, megállapítottuk a kalázhosszt (több kalász esetén a főhajtás kalászának hossza) és a növényenkénti termést, illetve kiszámítottuk az ezerszemtömeget.

3.2.7.3. Statisztikai értékelés

A növénynevelés 12-18. hetében végzett klorofilltartalom-mérés adatait kétváltozós lineáris regresszióanalízissel elemeztük. Sváb (1981) nyomán meghatároztuk a Bravais-féle korrelációs koefficiens becslt értékét (r), valamint a regressziós egyenletet ($Y' = a + bX$). Elvégeztük a mock inokulált és a vírussal inokulált növénycsoportban kiszámított regressziós koefficiensnek (b) különbségének szignifikanciavizsgálatát is $P = 1\%$ hibavalószínűségi szinten, $FG = n_1 + n_2 - 4$ szabadságfokú t -próba segítségével az alábbi képlet szerint:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{\frac{\text{Hiba } SQ_1 + \text{Hiba } SQ_2}{n_1 + n_2 - 4} \times \left(\frac{1}{SQ_{X_1}} + \frac{1}{SQ_{X_2}} \right)}}$$

ahol b az egyes csoportok regressziós koefficiensét jelöli, SQ az egyes csoportok négyzetes eltéréseinek összege, n pedig az egyes csoportok adatpárjainak száma. Két regressziós koefficiens közötti különbséget akkor tekintettünk szignifikánsnak, ha a számított t -érték nagyobb volt, mint a táblázati kritikus t -érték.

A betakarítás után meghatározott agronómiai adatok tekintetében a mock inokulált, valamint a vírussal inokulált növények csoportjában a vad típusú törzs (kontroll) és annak TDH változatai között kapott különbségek statisztikai elemzését egytényezős

varianciaanalízissel végeztük el $P = 5\%$ hibavalószínűségi szinten. Az egyes genotípusokon belül a mock inokulált (kontroll) és a vírussal inokulált növények között kapott különbségeket középérték analízissel értékeltük ki (két középérték összehasonlítása, ha az adatok száma eltérő) szintén $P = 5\%$ hibavalószínűségi szinten. Utóbbi számítások során azokban az esetekben, amikor az összehasonlítandó adatok szórása statisztikailag lényegesen különbözött egymástól (a két szórásnégyzet egymás háromszorosa, vagy még többszöröse volt), a két középérték különbségének szórását (s_d) az

$$s_d = \sqrt{\frac{(SQ_1 + SQ_2)(n_1 + n_2)}{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}}$$

képlet helyett az

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

képlettel határoztuk meg, és a számított t -értéket nem a táblázati t -értékkel hasonlítottuk össze, hanem t' -vel jelzett kritikus t -értéket számítottunk:

$$t' = \frac{s_1^2 t_1 + s_2^2 t_2}{s_1^2 + s_2^2}$$

ahol t_1 és t_2 a t -táblázat értékei, t_1 szabadságfokainak száma $n_1 - 1$, és t_2 szabadságfokainak száma $n_2 - 1$, továbbá s_1^2 , illetve s_2^2 a két mintából számított szórásnégyzet. Két középérték közötti különbséget akkor tekintettünk szignifikánsnak, ha a számított t -érték nagyobb volt, mint a táblázati kritikus t -érték, illetve – lényegesen különböző szórások esetén – ha a számított t -érték nagyobb volt, mint a számított kritikus t' -érték. A vírussal inokulált csoportban előforduló steril növények adatait nem hagytuk figyelmen kívül.

3.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel

Célunk volt annak megállapítása, hogy a 3.2.5.3. fejezetben ismertetett primerek alkalmasak-e vírusdiagnosztikai vizsgálatok elvégzésére, valamint a szerológiai és a molekuláris detektálás érzékenységének összehasonlítása.

3.3.1. Növényanyag

Tizenkét államilag elismert szegedi őszi búzafajta (Élet, Garaboly, Kalász, Verecke, Ati, Tisza, Békés, Csillag, Petur, Hattyú, Holló és Piacos) vírusfertőzöttségét teszteltük le szerológiai és molekuláris módszerekkel. A

kísérletet a 2006/2007-es tenyész-időszakban végeztük el, amikor a különösen enyhe őszi és téli időjárás miatt a vírusvektor szervezetek az átlagosnál jobban elszaporodtak. Egy korai (október első dekádja) és egy késői (november első dekádja) vetésidőt alkalmaztunk. A vírusvektor szervezetek betelepülésének provokálása érdekében a fajtákat kétsoros parcellákba vetettük el a tenyészkertben tág térállásban, dupla gabona sortávolságra. Parcellánként két növényegyed véletlenszerű kiválasztásával április végén begyűjtöttük a levélmintákat, a főerre merőleges vágással kétfelé vágtuk azokat és egyik részüket DAS-ELISA, a másikat PCR vizsgálatnak vetettük alá. Az első kísérlet csak részleges eredményekkel szolgált, ezért szükség volt egy második mintavételre is, ami május közepén történt. Itt már nem fajták szerint, hanem véletlenszerűen választottunk ki 30 db tünetes növényt a korán vetett csoportból.

3.3.2. Szerológiai teszt

A begyűjtött levelek vírusfertőzöttségét ugyanúgy határoztuk meg, amint azt a 3.2.7.2. fejezetben leírtuk – azzal a különbséggel, hogy ebben a kísérletben a BSMV-n kívül értelemeszerűen BYDV-re, WDV-re és WSMV-re specifikus antiszérumokat (Loewe Biochemica) is felhasználtunk.

3.3.3. Molekuláris teszt

A levélmintákat a főér mentén hosszanti irányban kettévágtuk és az egyik felülből genomi DNS-t, a másik felülből pedig összes RNS-t izoláltunk. A nukleinsavak amplifikációra való alkalmasságát a „TaUbi306 for” + „TaUbi664 rev” primerpár segítségével ellenőriztük. A minták WDV-fertőzöttségének megállapításához a kinyert genomi DNS-eket használtuk templátként és normál PCR-t futtattunk le, míg a másik három vírus detektálásához az izolált összes RNS-t alkalmaztuk és egylépéses RT-PCR-t futtattunk le. A munka során a következő primerpárokat vittük reakcióba: BSMV Bb 156 for + BSMV Bb 1178 rev; PAV Sal2 S for + PAV Sal2 S rev; WDV S for + WDV S rev; WSMV 1000 for + WSMV 1565 rev. Negatív kontrollnak desztillált vizet, pozitívnak pedig a transzformációs munkaszakaszban kifejlesztett plazmidokat, illetve a szerológiai vizsgálatok során fertőzöttnek bizonyult növényekből izolált nukleinsavakat alkalmaztunk. Az itt ki nem fejtett módszereket a 3.2.5. fejezetben már részletesen ismertettük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Széles spektrumú gyomirtószerral szembeni rezisztencia vizsgálata

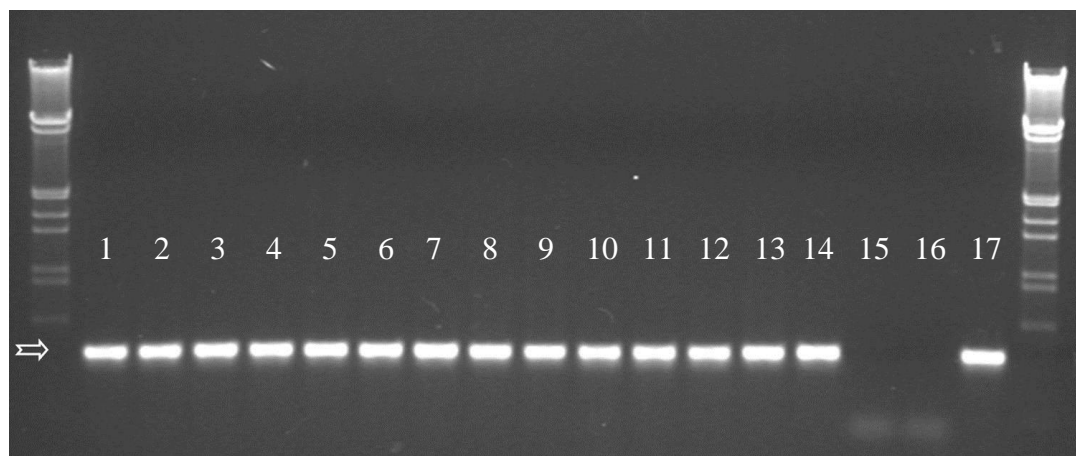
Glufozinát-ammónium terméskialakító komponensekre gyakorolt komplex hatását elemeztük egy olyan búzatörzsben, amely expresszája a hatóanyagot detoxifikáló *bar* gént.

Előzetes kísérletben meghatároztuk a glufozinát-ammónium letális dózisát. A vad típusú CY-45 búzatörzs embrióit *in vitro* csíráztattuk. Kizárólag a herbicidmentes táptalajra helyezett embriók csíráztak ki, az 1-4 mg·l⁻¹-es glufozinát-ammónium tartalmú táptalajokon sem gyökér, sem hajtás nem fejlődött (7. ábra). Tehát esetünkben a glufozinát-ammónium letális dózisának 1 mg·l⁻¹ alatt kellett lennie.



7. ábra. Vad típusú CY-45 búzatörzs érett embrióinak csírázása 0, 1, 2, illetve 4 mg·l⁻¹ glufozinát-ammónium koncentrációjú (balról jobbra) táptalajon. Méretvonal: 1,0 cm

A herbicidrezisztencia teszt során – amint az várható volt – nem tapasztaltuk a kísérleti populáció genetikai hasadását a *bar* génre nézve. Ezt RT-PCR-rel is alátámasztottuk (8. ábra). Minden embrió kicsírázott herbicidterhelés mellett is, ebből adódóan a tesztet 112 búzanövénnyel végeztük el. Az embriók azonos intenzitással csíráztak, de 5000 mg·l⁻¹ hatóanyag már lassította a folyamatot: ezeknek a növénykének még csak 1 cm hosszú volt a hajtásuk, amikor a többi táptalajon növekedőknek már 11-12 cm-es (9. ábra). Ez a különbség betakarításig megmaradt és a legnagyobb koncentrációjú kezelés három héttel megnövelte a tenyészidőt (10. ábra). Leszámítva a fenti megfigyelést, sikeresen felneveltük mindegyik növényt, és összesen 773 darab kalászt (100%) takarítottunk be. Vizuális alapon a szemek kiteltségét figyelembe véve két csoportra osztottuk a kalászokat (11. és 12. ábra): jól termékenyült 311 darab (40,2%), illetve rosszul termékenyült 462 darab (59,8%). A részlegesen steril (19 kalász; 2,4%) és a teljesen steril kalászokat (7 kalász; 0,9%) természetesen a rosszul termékenyült csoportba soroltuk.



8. ábra. A *bar* gén RNS-transzkriptumáról amplifikált RT-PCR termékek detektálása gélelektroforézissel. Primerek: bar5 for + bar6 rev. A fehér nyíl a 375 bázispár hosszúságú várt fragmentet mutatja. A gél szélső zsebeiben λ -DNS. Minták balról jobbra: 1-14: a növekvő herbicidkoncentráció szerinti kezelések (1 = 0; 14 = 5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammónium), 15: vad típusú CY-45 növény, 16: desztillált víz, 17: pAHC20 plazmid DNS



9. ábra. A CY-45 eredetű „T-124” búzatörzs érett embrióinak csírázása 0, 200, 400, 600, 800, 1000 és 5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammónium (balról jobbra) tartalmú táptalajon. Méretvonal: 1,0 cm



10. ábra. Csírázás során $5000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ glufozinát-ammóniummal kezelt növények (jobbra) tenyészideje három héttel kitolódott a kezletlen kontroll növényekéhez képest (balra)



12. ábra. Jól (felül) és a rosszul (alul) termékenyült kalászek szemtermései. A kontroll (balra) és az $5000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es kezelés (jobbra) eltérő méretű és alakú szemeket eredményezett. Méretvonal: 0,5 cm



11. ábra. Jól (a 3 baloldali) és rosszul (a 3 jobboldali) termékenyült kalászek. Méretvonal: 2 cm

Mérési adatainkat és azok statisztikai értékelését a *12. táblázatban* közöljük. A jól termékenyült csoportban a növényenkénti kalászsám 2,38 és 3,13 között változott, ami nem jelentett szignifikáns eltérést. Ezzel szemben ugyanez a paraméter a rosszul termékenyült csoportban a három legmagasabb koncentrációjú kezelés hatására látványosan megnövekedett. A legintenzívebb hajtásfejlődés 5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammónium hatására következett be, ezeken a növényeken erőteljes bokrosodást figyeltünk meg (*13/a. ábra*). Az adatok három szignifikancia szintet reprezentáltak.

A kalásonkénti szemszám a jól termékenyült csoportban 21,09 és 17,43 között változott. Utóbbit 5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammónium okozta és ez szignifikánsan kevesebb, mint a többi kezelés esetében. Összehasonlításképpen a rosszul termékenyült csoportban a kalásonkénti szemszám 21,56 és 12,65 között alakult (*13/b. ábra*), ami három szignifikancia szintnek felelt meg. Érdekes, hogy a 16 és a 200-800 mg·l⁻¹ kezelések ugyanazt a szignifikancia szintet eredményezték.

Az ezerszemtömeget a kalások betakarítása után számítottuk ki a termés mennyiségéből. Természetesen a két csoport ebben a mérőszámban különbözött leginkább egymástól. A jól termékenyült kalások esetében 37,19 g és 28,21 g között változott az ezerszemtömeg, míg a másik csoportban 29,84 g és 16,92 g között alakult (*13/c. ábra*). Előbbi három, utóbbi négy szignifikancia szintnek felelt meg.

A kalások termésadatait kiértékelés előtt átlagolás helyett összesítettük, így megkaptuk a növényenkénti termést mind a jól, mind a rosszul termékenyült csoportban. Ez a paraméter hasonlóképpen változott: 2,15 g és 1,43 g között a jól termékenyült kalások esetében, míg 2,18 g és 1,03 g között a másik csoportban (*13/d. ábra*). Figyelemre méltó, hogy a rosszul termékenyült kalások esetében a glufozinát-ammónium nem a legmagasabb, hanem 128-600 mg·l⁻¹-es koncentrációban okozott szignifikáns termésvesztést.

Mivel a termés a legfontosabb agronómiai paraméter, kiszámoltuk a növényenkénti teljes termés alakulását is a jól és a rosszul termékenyült kalások eredményeinek összesítésével. Ebben az esetben az adatok 4,32 g és 2,64 g között változtak (*13/e. ábra*). A kontroll növényekhez képest a 128-5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammóniummal kezelték – kivéve az 1000 mg·l⁻¹-es kezelést – teljes termése 3 gramm alá csökkent, ami szignifikáns változást jelentett.

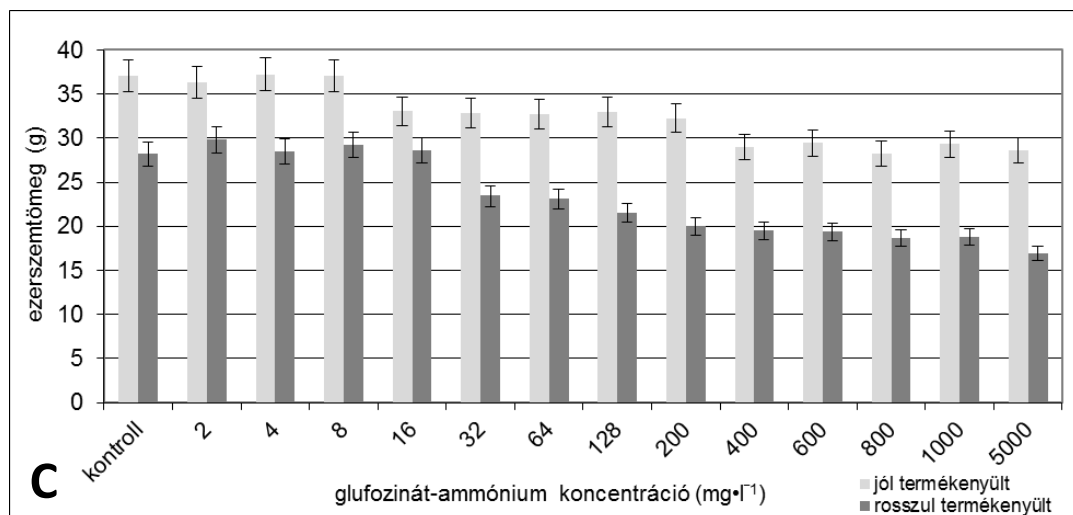
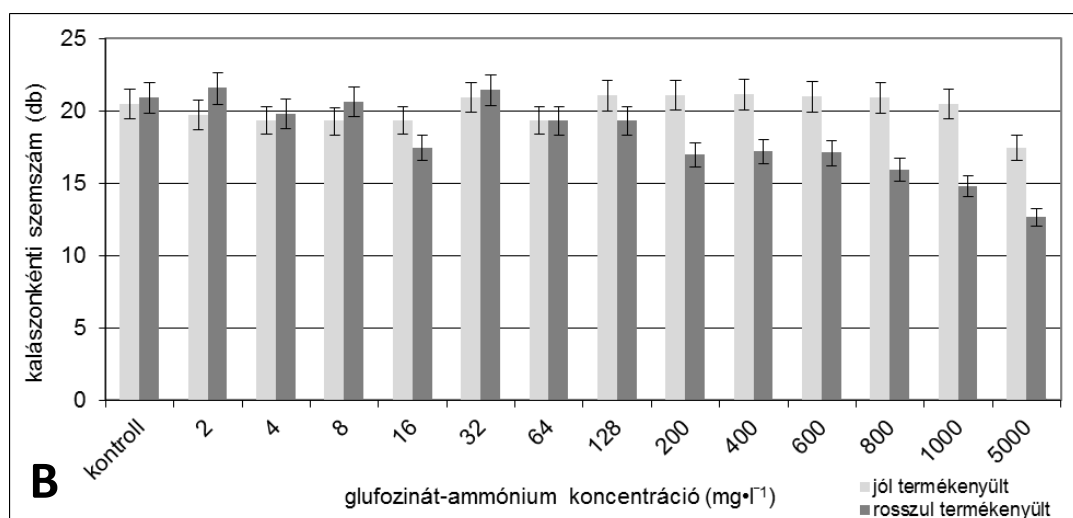
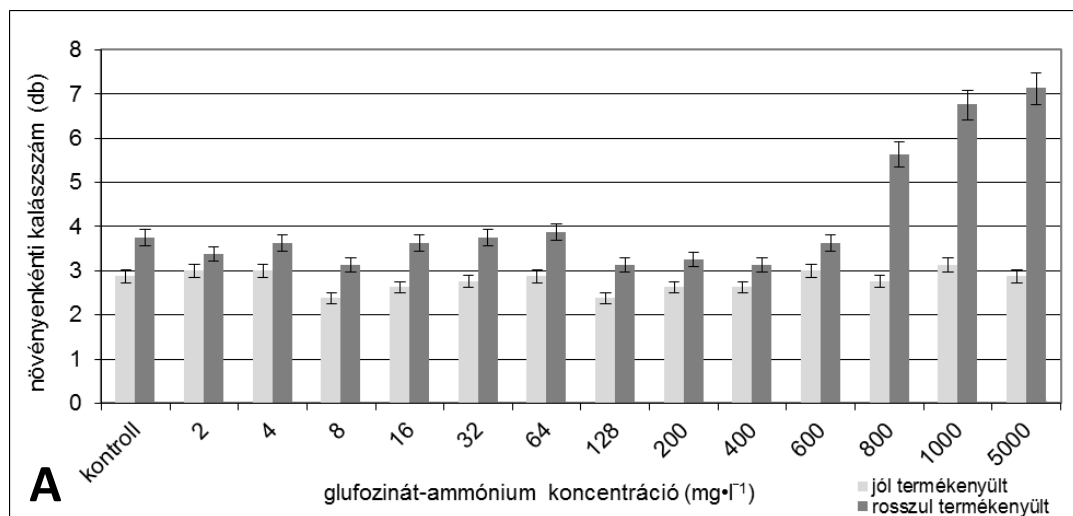
Ha a kontroll kezelés értékeit 100 %-nak tekintjük, s ehhez viszonyítjuk a kezelésekkal kapott adatokat, még részletesebb képet kaphatunk a glufozinát-ammónium terméskialakító komponensekre gyakorolt hatásáról. A két csoport közötti legfeltűnőbb különbség a növényenkénti kalászsám 190% fölé emelkedése volt a rosszul termékenyült csoportban a legmagasabb herbicidkoncentráció hatására. A többi vizsgált tulajdonság hasonló irányban, de eltérő szignifikancia szinteken változott a két csoport esetében.

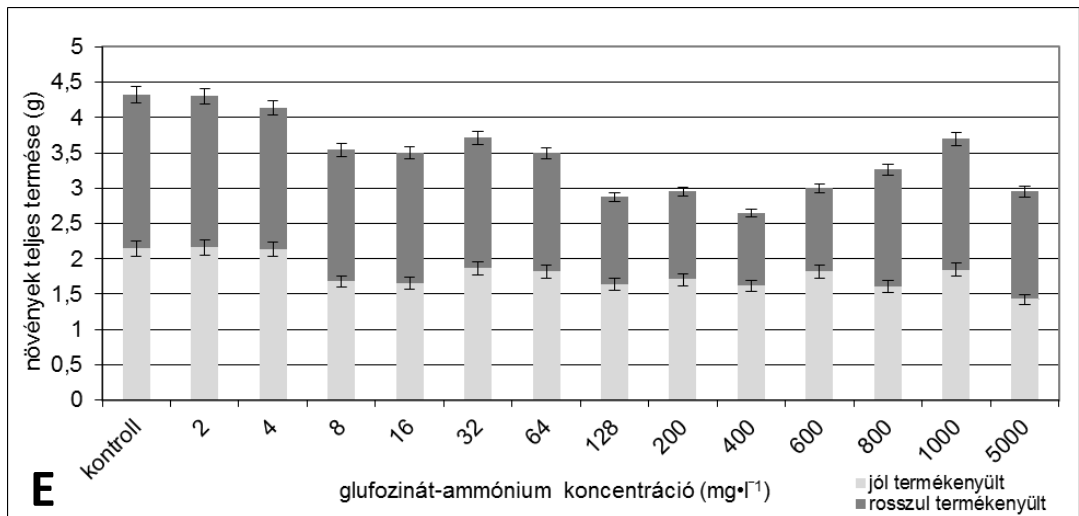
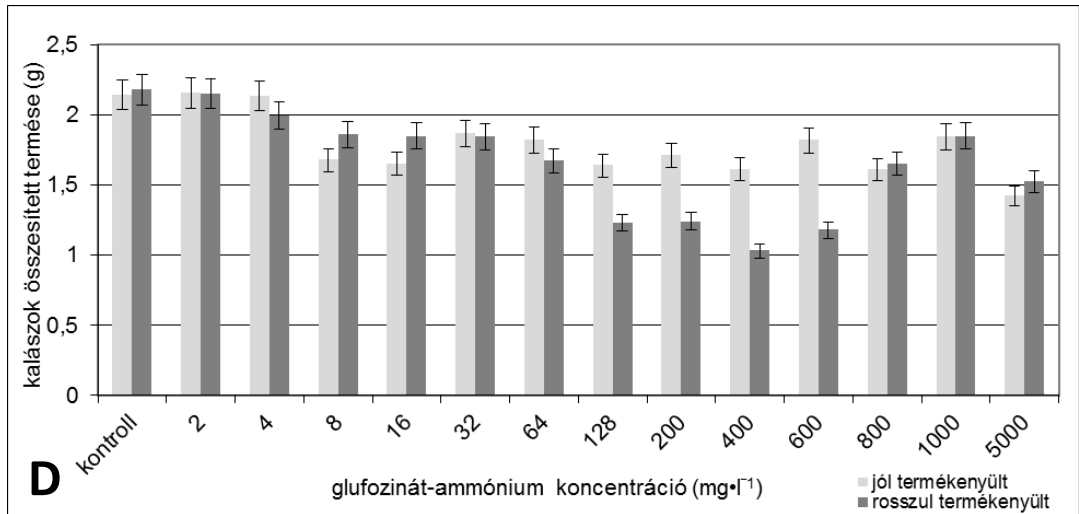
Összegzésképpen elmondhatjuk, hogy a glufozinát-ammónium statisztikailag igazolható hatást váltott ki a kísérlet során, a szignifikáns változások azonban más-más koncentrációnál jelentkeztek az egyes agronómiai paramétereknél.

12. táblázat. Egytényezős varianciaanalízis eredményei $P = 5\%$ hibavalószínűségi szinten. Az adatok a nyolc ismétlés átlagának felelnek meg. Jelölések: X_1 : jól termékenyült kalászkok; X_2 : rosszul termékenyült kalászkok; X_3 : teljes növény. Szignifikáns eltérésre a kis betűk változása utal

Kezelés ($mg \cdot l^{-1}$)	Kalászsorszám (db)		Kalászonkénti szemszám (db)	
	X_1	X_2	X_1	X_2
0	2,88 a	3,75 a	20,47 a	20,91 a
2	3,00 a	3,38 a	19,73 a	21,56 a
4	3,00 a	3,63 a	19,33 a	19,80 a
8	2,38 a	3,13 a	19,29 a	20,64 a
16	2,63 a	3,63 a	19,33 a	17,46 b
32	2,75 a	3,75 a	20,94 a	21,41 a
64	2,88 a	3,88 a	19,33 a	19,31 a
128	2,38 a	3,13 a	21,06 a	19,30 a
200	2,63 a	3,25 a	21,09 a	16,98 b
400	2,63 a	3,13 a	21,10 a	17,18 b
600	3,00 a	3,63 a	20,97 a	17,09 b
800	2,75 a	5,63 B	20,90 a	15,92 b
1000	3,13 a	6,75 C	20,45 a	14,79 c
5000	2,88 a	7,13 C	17,43 b	12,65 c
SzD _{5%}	1,051	1,111	1,893	2,274

Kezelés ($mg \cdot l^{-1}$)	Ezerszemtömeg (g)		Termés (g)		
	X_1	X_2	X_1	X_2	X_3
0	37,06 a	28,18 a	2,14 a	2,18 a	4,32 a
2	36,32 a	29,84 a	2,15 a	2,15 a	4,30 a
4	37,19 a	28,46 a	2,14 a	2,00 a	4,14 a
8	37,05 a	29,23 a	1,68 a	1,86 a	3,54 a
16	32,99 b	28,61 a	1,65 a	1,85 a	3,50 a
32	32,83 b	23,44 b	1,87 a	1,84 a	3,71 a
64	32,70 b	23,07 b	1,82 a	1,67 a	3,49 a
128	32,94 b	21,51 b	1,64 a	1,23 b	2,87 b
200	32,23 b	19,93 c	1,71 a	1,24 b	2,95 b
400	28,94 c	19,47 c	1,61 a	1,03 b	2,64 b
600	29,41 c	19,35 c	1,82 a	1,18 b	3,00 b
800	28,21 c	18,62 c	1,61 a	1,65 a	3,26 b
1000	29,27 c	18,77 c	1,84 a	1,85 a	3,69 a
5000	28,61 c	16,92 d	1,43 a	1,52 a	2,95 b
SzD _{5%}	1,855	1,947	0,836	0,734	0,846





13. ábra. A glufosinát-ammónium különböző koncentrációinak hatása a növényenkénti kalászsámra (A), a kalásonkénti szemszámra (B), az ezerszemtömegre (C), a kalászkok összesített termésére (D), valamint a növények teljes termésére (E) a „T-124” búzatörzs esetében. Az értékek a kísérlet nyolc ismétlésének átlagát mutatják

4.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata

Célunk olyan homozigóta búzatörzsek létrehozása volt, amelyekben a növényi sejt ősi védekezési mechanizmusa, az RNS-interferencia révén korlátozott a hazánkban előforduló négy legfontosabb gabonavírus replikációja, ezért a növények rezisztensek lehetnek e kórokozókkal szemben.

4.2.1. Vektormolekulák beépítése búzába

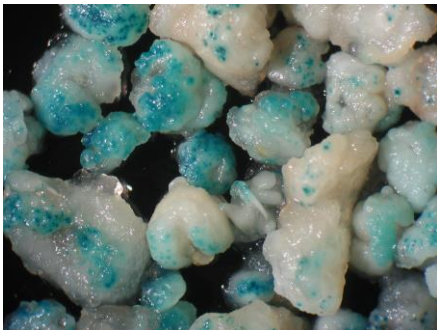
Elsőként a PDS1000/He részecskebelövő berendezés beállításait optimalizáltuk a pBAJEN-*gus* tesztplazmiddal. Petri-csészénként 50, összesen 400 embriórt áldoztunk erre a célra. Az X-gluc pufferes inkubációt követően a kék pöttyöket megszámlálva sűrűn elhelyezett kallusok, 1100 psi nyomás, illetve a makro hordozókorong és a célszövet közötti 6 cm-es távolság esetén kaptuk a legtöbb tranziens expressziós mintázatot (13. táblázat és 14. ábra), ezért ezeket a paramétereket alkalmaztuk a folytatásban.

13. táblázat. Részecskebelövő berendezés optimalizálása a pBAJEN-*gus* vektorral

elrendezés	kallusok szétszórta *				kallusok sűrűn **			
	6		9		6		9	
távolság (cm)	6		9		6		9	
nyomás (psi)	1100	1350	1100	1350	1100	1350	1100	1350
találatok száma	151	193	328	227	536	509	475	479

* 10 cm átmérőjű Petri-csészében, egyenletesen elosztva a táptalajon

** 5 cm átmérőjű Petri-csészében, szorosan egymás mellett a táptalaj közepén



14. ábra. Tranziens expressziós mintázatok a fenti táblázatban szürke háttérrel jelölt beállítás alkalmazásával, három nappal a transzformáció után

Munkánk során a pBAJEN plazmid hét változatát használtuk fel, amelyek a Magyarországon előforduló négy legjelentősebb gabonavírussal, a BSMV-vel, a BYDV-vel, a WDV-vel és a WSMV-vel szemben biztosíthatnak rezisztenciát a

vektort expresszáló növények számára. Négy plazmid (A-D) csak az egyik vírusnak megfelelő szekvenciákat hordozta, két másik (E-F) egyszerre kettő kórokozó ellen lehet hatékony, míg a hetedik (G) mind a négy vírussal szemben védelmet nyújthat.

Kísérletünk első évében az A-, B-, C- és D-plazmidokkal dolgoztunk. A második évben elkészültek az E-, F- és G-vektorok is, így akkortól már ez utóbbiak használtára helyeztük a hangsúlyt. A fordítva ismétlődő szekvenciák búza sejtekbe építése tehát körülbelül két évet vett igénybe, amely idő alatt 251 Petri-csészényi mennyiséget kitevő, azaz mintegy 12550 darab éretlen embriót izoláltunk. Közülük 12250 darab a CY-45 eredetű volt, míg 6 tenyészet, azaz 300 darab embrió a GK Tavasz búzából származott. A munka során 7 alkalommal további egy-egy CY-45 tenyészetet iktattunk be kontroll gyanánt, amelyeket nem transzformáltunk, hanem a növény-sejt-növény rendszer hatékony működését teszteltük velük. Amint a *15. ábrán* is látható, a totipotens kalluszok szöveti redifferenciációs képessége kifogástalan volt.



15. ábra. Szövettenyésztési háttér működőképességének ellenőrzése nem szelektív tápközegeken. Balról jobbra: a regeneráció első jelei; gyökérkezdemény; gyökert és hajtást is fejlesztő kalluszok; regenerált növénykék fiolákban

Legnagyobb mennyiségű tenyészetet, szám szerint 45-öt a G-jelű plazmiddal transzformáltunk, legkevesebbet pedig az A-jelű vektorral, amelyet 19 alkalommal használtunk. A *14. táblázatból* azonban az is kiderül, hogy a recipiens kolóniák száma nem volt arányban a fiolába ($\frac{1}{2}MS_0$ regenerációs táptalajra) helyezhető kalluszok mennyiségével. Például a B- és a C-plazmiddal transzformált tenyészetek száma lényegében azonos volt, ennek ellenére a regenerálódásnak indult, fiolába rakott kalluszok száma kétszeres eltérést mutatott. A fiolákba mért, $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ glufozinát-ammóniummal kiegészített táptalaj hatására számos zöldülő kallusz elpusztult (a B-plazmidnál a teljes mennyiség 60 %-a, a D-nél 85 %-a), jelezve a *bar* markergénre alapozott szelekció hatékonyságát. Üvegházba 673 növényt ültettünk ki, ám legnagyobb igyekezetünk ellenére csak 486-ot tudtunk felnevelni. Ezeket a szelekció utolsó lépéseként 4-5 leveles korukban lepermeteztük Finale 14 SL herbiciddel. A kezelést követően a túlélési arány 3 % (F-plazmid) és 84 % (A-plazmid) közöttinek bizonyult. A kísérletsorozat volumene indokoltá tette a

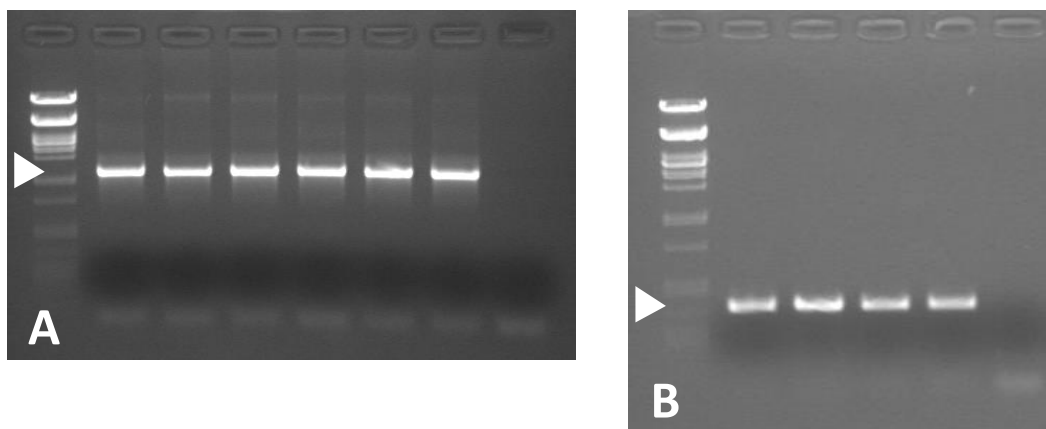
növények egyedi megjelölését. Munkánk *in vitro* fázisában beszámoltuk a kallusz-tenyészeteket 1-től 258-ig. Ez a jelölés a kísérlet végéig érvényben maradt azáltal, hogy a regenerált növények is ezt a számot kapták. Amennyiben egy kalluszkultúrából több növényt is sikerült regenerálnunk, azokat „/”-jellel különítettük el egymástól. Néhány példa az azonosításra: 6; 108; 5/2 vagy 223/12. Kísérletünkben 37 olyan CY-45 és 1 olyan GK Tavasz tenyészetéről tudunk beszámolni, amelyből a permetezést túlélő növényt vagy növényeket kaptunk – ez mindkét genotípus esetén a teljes mennyiség 15 %-a. Közülük 19-ről elmondható, hogy csak egyetlen növényt tudtunk belőle felnevelni. Akadt azonban négy olyan is, amelyből 10-nél több regenerált egyed élte túl a permetezést. Amint a 14. táblázatból is kitűnik, összesen 117 növényt neveltünk tovább, amelyekről molekuláris vizsgálatokkal állapítottuk meg, hogy valóban hordozzák-e és expresszálják-e a beépíteni kívánt DNS-szakaszokat.

14. táblázat. A növényregeneráció és a *bar* génre alapozott szelekció eredményei

plazmid	transzformációra felhasznált tenyészetek	fiolába helyezett zöldülő kalluszok	üvegházba kiültetett növények	Finale 14S L herbiciddel lepermetezett növények	permetezést túlélő növények
A	19	353	115	50	42
B	42	520	210	178	17
C	43	273	73	37	3
D	33	180	28	16	9
E	30	97	32	20	12
F	39	318	86	82	3
G	45	776	129	103	31
összesen	251*	2517	673	486	117

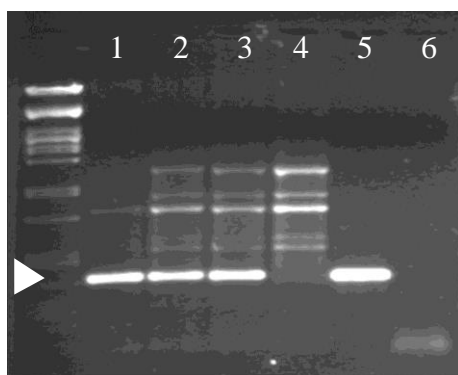
* A szövettenyésztési háttér ellenőrzésére használt, nem transzformált kultúrákkal együtt a tenyészetek száma héttel több volt. Ez az oka annak, hogy az eredmények további ismertetése során szó lesz 251-nél nagyobb sorszámú növényről is.

Molekuláris vizsgálatainkat a nukleinsavak izolálásával kezdtük. Valamennyi növényi mintából megfelelő koncentrációjú DNS-t és RNS-t sikerült kinyernünk. Az ubiquitin-ligáz génre tervezett primerpárral tesztelő PCR-eket végeztünk és megállapítottuk, hogy mind hagyományos PCR (genomi DNS templát), mind RT-PCR (összes RNS templát) után detektálható volt a várt fragment az összes minta esetében (16. ábra). Ez az eredmény azt az információt adta, hogy a nukleinsavminták alkalmasak polimeráz láncreakcióval történő további vizsgálatokra.



16. ábra. Tesztelő PCR-ek után készült gélfotók. Mindkét esetben a „TaUbi306 for” + „TaUbi664 rev” primerpárt alkalmaztuk. A gélek jobb szélő zsebeiben a negatív (desztillált vizes) kontrollt futtattuk. A többi zsebben véletlenszerűen kiválasztott T₀ növények mintái szerepelnek. A bal szélő zsebekben λ-DNS látható. Az „A” fotó hagyományos PCR-t mutat be genomi DNS-templáttal, a „B” fotó pedig RT-PCR-t összes RNS templáttal. Előbbi esetben a várt fragment 1200 bp, míg az utóbbinál csak 358 bp, mivel egy 842 bp méretű intron található az amplifikálni kívánt szekvenciában

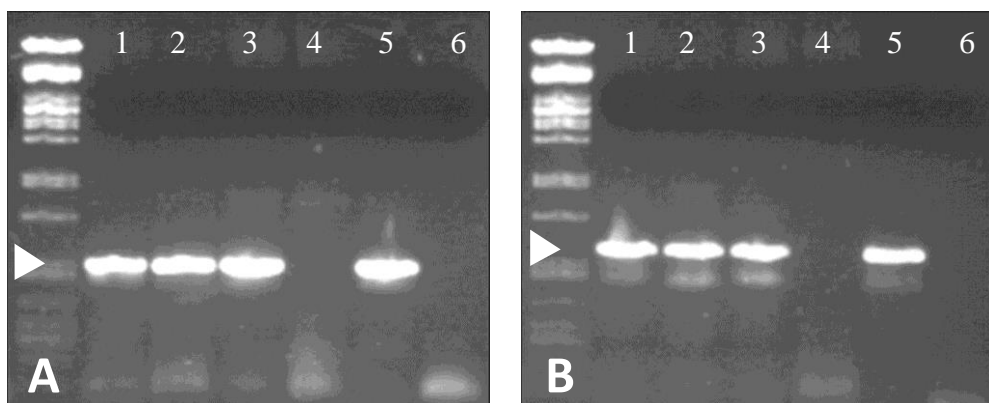
Munkánkat a *bar* markergén kimutatásával folytattuk. Mind a 117 vizsgált növény nemcsak hordozta, expresszálta is a herbicidrezisztencia gént (15. táblázat). A fenotípus (tünetmentes növények a permetezést követően) és a genotípus tehát minden esetben megerősítette, alátámasztotta egymást. Néhány példát a 17. ábrán mutatunk be ebből a kísérletből.



17. ábra. Genomi DNS templáttal indított PCR a *bar* gén integrációjának bizonyítására. Primerek: bar5 for + bar6 rev. Várt fragment: 375 bp. Minták balról jobbra: λ-DNS; 1-3: T₀ növények (1, 2, 5/2); 4: vad típusú CY-45; 5: pozitív kontroll (plazmid-DNS); 6: negatív kontroll (desztillált víz)

A molekuláris tesztelés lényegi részét a fordítva ismétlődő DNS-szakaszok integrálódásának és expressziójának kimutatása jelentette PCR, illetve RT-PCR módszerekkel. A vektorkonstrukciók számából, a szensz és antiszensz

szekvenciákból és a kétféle technikából adódóan 28-féle reakciót kellett lefuttatnunk. Az összes gélfotó közlésétől e helyen eltekintünk, csak kettőt mutatunk be a 18. ábrán. Számszerűsítve a 15. táblázatban foglaljuk össze a kapott eredményeket. Nem talákoztunk olyan esettel, hogy valamelyik célszekvencia integrálódott ugyan a recipiens növényi genomba, de arról ne történt volna transzkripció – vagyis PCR és RT-PCR során a minták ugyanazokat a jeleket adták. Olyan eset sem fordult elő, hogy a szensz- és antiszensz orientációban beépített DNS-szakaszok ne együttesen lettek volna jelen – tehát az RNS interferencia működésének alapjául szolgáló dsRNS-ek kialakulásának nem volt elvi akadály. A 15. táblázatból kitűnik, hogy a *bar* markergén csak a B-, C- és F-vektorok esetében jelezte egyértelműen a vírusrezisztenciát eredményező DNS-szakaszokat. A G-plazmidnál a markergént expresszáló növényeknek 45 %-a, míg az A-plazmidnál csak 19 %-a hordozta a fordítva ismétlődő szekvenciákat. Legrosszabb adatainkat a D- és az E-plazmiddal kaptuk, mivel a markergén jelenlétének és kifejeződésének ellenére egyetlen növényből sem tudtuk detektálni a WSMV, illetve a (BYDV + WDV) célszekvenciákat. A molekuláris tesztelés során 44 pozitív növényt kaptunk, amelyekről összesen 628 szemet takarítottunk be. Hat növény (7/2, 183, 184, 189/1, 120/1, 226/2) sterilnek bizonyult, így az átlagos szemertermés 14,3 db/egyed szintet ért el. A termésadatok azonban igen nagy szórást mutattak: 13 növény 10-nél kevesebb szemet, 10 növény 11-19 db szemet, 11 növény 10-29 db szemet, 4 növény pedig 30-nál több szemet nevelt (16. táblázat).



18. ábra. Az A-plazmiddal bejuttatott vírusspecifikus szekvenciák expressziójának kimutatása RT-PCR-rel T_0 búzanövényekből. Az ábra „A” részén a szensz, míg a „B” részén az antiszensz orientációban beépített szekvenciák láthatók. Előbbi esetben a várt fragment mérete 1022 bp (BSMV Bb156 for + BSMV Bb1178 rev primerpár), utóbbinál 1593 bp (BSMV Bb156 for + Nos-T 2028 rev primerpár).

Minták mindkét gélfotón: λ -DNS;

1-3: A-plazmiddal transzformált T_0 növények (1, 2, 5/2);

4: vad típusú CY-45; 5: pozitív kontroll (plazmid-DNS);

6: negatív kontroll (desztillált víz)

15. táblázat. Polimeráz lánreakciók eredményei számokban

plazmid	permetezést túlélő növények	<i>bar</i> génre pozitív növények		szensz szekvenciára pozitív növények		antiszensz szekvenciára pozitív növények	
		PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR	PCR	RT-PCR
A	42	42	42	8	8	8	8
B	17	17	17	16	16	16	16
C	3	3	3	3	3	3	3
D	9	9	9	0	0	0	0
E	12	12	12	0	0	0	0
F	3	3	3	3	3	3	3
G	31	31	31	14	14	14	14

16. táblázat. Fordítva ismétlődő szekvenciákat expresszáló növények termésadatai

A-plazmid		B-plazmid		C-plazmid		F-plazmid		G-plazmid	
sorszám	termés (db szem)	sorszám	termés (db szem)	sorszám	termés (db szem)	sorszám	termés (db szem)	sorszám	termés (db szem)
1	22	179/2	8	20	24	120/1	0	222	12
2	21	180/1	33	62	9	120/2	25	223/9	7
5/2	34	180/2	27	193	13	124	4	223/10	3
7/2	0	180/3	3					223/12	30
47	23	180/4	18					223/13	7
48/1	19	180/5	28					224	19
48/2	33	180/6	10					226/2	0
48/3	18	180/7	6					226/10	3
		181	26					227/1	28
		183	0					227/2	9
		184	0					227/3	8
		186/1	22					243	1
		186/2	13					249	17
		188	2					257	29
		189/1	0						
		189/2	14						
össz.	170		210		46		29		173

A szürke háttérű növény GK Tavasz genotípusból származott, a többi CY-45 eredetű.

4.2.2. Homozigóta búzatörzsek előállítása

Amint az előző fejezetben ismertettük, a T_0 növényekről magot fogtunk. Mivel célunk a növények rezisztenciájának megismerése, ezért olyan kísérleti populációkat kívántunk előállítani, amelyek a beépített szekvenciákra nézve genetikailag nem hasadnak, s ebből kifolyólag kórtani tesztek során az egy törzsbe



tartozó növényektől hasonló válaszreakciót várhatunk. Esetünkben törzsnek nevezzük az egyes T_0 növények – azaz a független transzformánsok – utódai-ból álló növénypopulációt.

A genetikai hasadás elkerülése érdekében portoktenyésztés alkalmazásával TDH búzatörzsek előállítását kíséreltük meg. Törzsenként legalább 10 kalászból akartuk indítani a portoktenyészeteket és a biztonságra törekedve még tartalék vetőmagot is akartunk képezni. Ugyanakkor a 16. táblázatban már bemutattuk, hogy 13 T_0 növény 10-nél kevesebb szemet termelt, sőt a 243-as például mindössze 1 szemet. Ezért úgy döntöttünk, hogy szükség szerint felszaporítjuk a vetőmagokat és a T_1 , T_2 vagy a T_3 generáció egyedeiből izolálunk portokokat. Mivel a kísérletnek ebben a fázisában még számolnunk kellett a genetikai hasadással, nem nélkülöztük a *bar* marker-génre alapozott szelekciót: a növényeket lepermeteztük Finale 14 SL herbiciddel, és csak a tünetmentes egyedek kalászait használtuk donor-ként (19. ábra).

19. ábra. Transzformáns dihaploid növények előállításának folyamata. Portok izolálás céljából vetett donor növényanyag $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os klímakamrában (A) és zárt rendszerű üvegházi kabinban (B). Az izoláláshoz ideális állapotot – a kalászok „hasban” vannak – a fehér nyíl jelzi (C). Folytatás a túloldalon

Munkánk során 21 CY-45 és 1 GK Tavasz eredetű búzatörzs dihaploid változatát állítottuk elő. Eredményeinket a 17. táblázatban közöljük részletesen. A donor kalászok számához viszonyított zöld növény kihozatal az 1, 5/2, 20, 47, 180/7, 189/2 és 249 jelű törzsek esetében bizonyult a legjobbnak, míg a 180/1, 180/4, 180/6, 223/12, 227/1, 227/2 számúaknál a legrosszabbnak – ezekből nem sikerült növényt regenerálnunk. Jóllehet a 17. táblázatból nem derül ki, de itt megemlítjük, hogy az albínó növények mennyisége valamilyeni törzs esetében elenyésző volt. Az *in vitro* regenerálódott növénykéket üvegházba ültettük ki, majd az aklimatizáció után lepermeteztük azokat Finale 14 SL herbiciddel. A túlélési arányok tág határok között változtak. A bargeént expresszáló növényeket tovább neveltük és fejlettségük, valamint terméskötődésük alapján elkülönítettük a haploidokat és a spontán dihaploidokat. Az arányok igen eltérőek voltak: a 223/10-es törzs mindegyik egyede spontán dihaploidnak bizonyult, ugyanakkor a 180/5-ös törzs növényeinek csak 16 %-áról mondható ez el. Általánosítva kijelenthetjük, hogy a permetezést túlélő egyedek 30-50%-a tekinthető spontán dihaploidnak. Ezeket a növényeket TDH₁ generáció néven vettük nyilvántartásba. Megjegyezzük,

19. ábra. Folytatás az előző oldalról. Formálódó fehér kolóniák W14_f tápoldatban (D) a kalluszindukció hatékonyságára utalnak. Regenerálódásnak indult kalluszok 190-2Cu táptalajon (E). Az ábra F-részén üvegházban felnevelt spontán dihaploid (balra) és haploid (jobbra) búzanövények láthatók

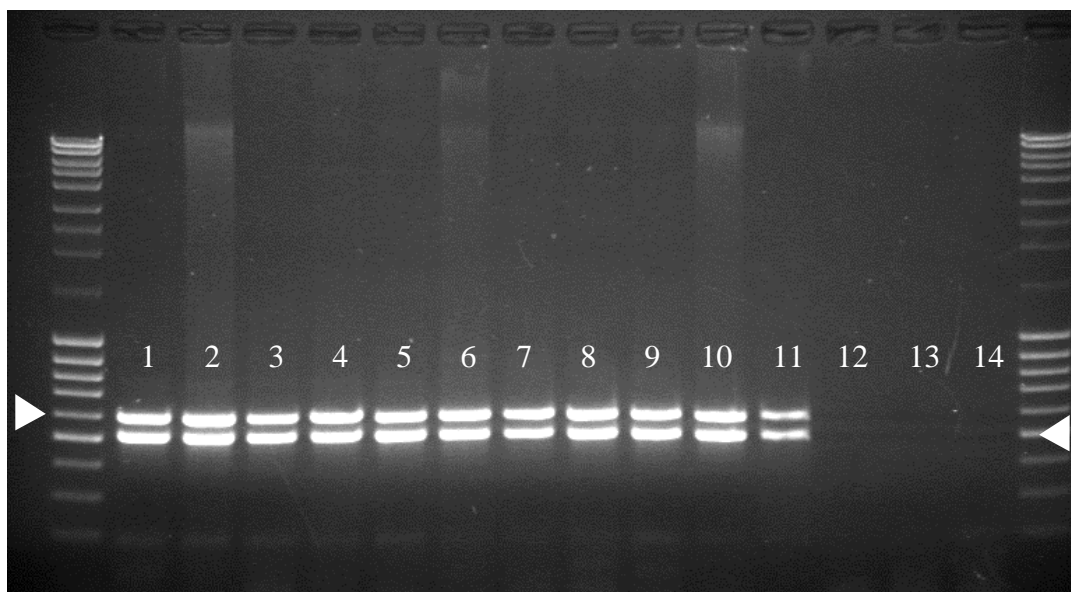


hogy nem minden búzatörzsből indítottunk portokkultúrát. Ennek egyik oka, hogy 6 T₀ növény eleve nem hozott termést. Néhány esetben (48/2, 48/3, 62, 186/2, 224, 226/10) a T₁ generáció egyetlen egyede sem élte túl a herbicid kezelést. Olyan is előfordult (120/2, 124), hogy a T₀ növény rendkívül gyenge szemeket nevelt, s a T₁ populáció permetezést túlélő egyedei nem fejlesztettek portokizolálásra alkalmas kalászt – így például az F-plazmiddal transzformáltak közül nem maradt donor növény. Mindazonáltal kísérletünk eredményes volt: 381 TDH₁ búzat állítottunk elő.

17. táblázat. Dihaploid búzatörzsek előállításának eredményei számokban

törzs sorszám	plazmid	donor generáció	donor kalászosok száma	regene- rált zöld	<i>bar</i> génre pozitív	haploid	spontán dihaploid	n ö v é n y e k s z á m a	
1	A	T ₂	20	153	143	70	73 (51 %)		
2		T ₂	19	34	21	13	8 (38 %)		
5/2		T ₁	18	141	123	47	76 (62 %)		
47		T ₂	16	113	106	68	38 (36 %)		
48/1		T ₂	18	34	22	12	10 (45 %)		
179/2	B	T ₂	7	17	7	5	2 (28 %)		
180/1		T ₁	12	0	0	0	0		
180/2		T ₁	11	8	5	2	3 (60 %)		
180/3		T ₂	18	18	11	3	8 (72 %)		
180/4		T ₂	11	0	0	0	0		
180/5		T ₁	10	37	30	25	5 (16 %)		
180/6		T ₂	13	0	0	0	0		
180/7		T ₂	5	50	43	27	16 (37 %)		
181		T ₁	10	28	24	15	9 (37 %)		
186/1		T ₁	10	25	20	15	5 (25 %)		
188		T ₂	18	49	42	27	15 (36 %)		
189/2		T ₂	11	60	55	29	26 (47 %)		
20		C	T ₂	18	72	60	34	26 (43 %)	
222	G	T ₂	15	8	5	3	2 (40 %)		
223/9		T ₂	14	9	5	2	3 (60 %)		
223/10		T ₂	15	3	2	0	2 (100 %)		
223/12		T ₁	13	0	0	0	0		
223/13		T ₂	12	6	5	2	3 (60 %)		
227/1		T ₁	19	0	0	0	0		
227/2		T ₂	14	0	0	0	0		
227/3		T ₂	18	14	11	4	7 (63 %)		
243		T ₃	17	9	6	2	4 (66 %)		
249		T ₂	20	97	88	48	40 (45 %)		

Viaszérés fenofázisban minden törzsből kiválasztottunk 4 egyedet, amelyeknél ismételtelen leellenőriztük a bejuttatott virális szekvenciák expresszióját RT-PCR-rel. Értelemszerűen azokban az esetekben, amikor 4-nél kevesebb növény alkotott egy törzset (179/2, 180/2, 222, 223/9, 223/10, 223/13), csak a rendelkezésre állókat elemeztük. Bizonyos törzseknél (20, 180/3, 227/3, 249) több, 7 illetve 8 növényt vizsgáltunk meg. Az összes gélfotó közlésétől ismételtelen eltekintünk, csak egyet mutatunk be a 20. ábrán. Az elemzett 91 növény közül csak a B-plazmiddal transzformált 179/2-es és a C-plazmiddal transzformált 20-as törzsből találtunk negatív egyedeket. A permetezést túlélő növények 97 %-a expresszálta a virális eredetű célszekvenciákat is, tehát sikeres volt a *bar* markergénre alapozott szelekció. A 381 TDH₁ növény termését egyedileg takarítottuk be, ez összesen 12653 db CY-45 eredetű és 188 db GK Tavasz eredetű szemet tett ki. A növények jelölését ettől kezdve a következőképpen módosítottuk: a törzs eredeti sorszámától kötőjellel elválasztva feltüntettük az adott dihaploid növény sorszámát (pl. 1-2, 180/7-4, 249-19). A molekulárisan jellemzetteket külön kezeltük, ezek termésadatait a 18. táblázatban ismertjük.



20. ábra. A B-plazmiddal bejuttatott vírusspecifikus szekvenciák expressziójának kimutatása RT-PCR-rel TDH₁ búzanövényekből. A gélen egyszerre futtattuk két reakció termékeit. A felső jelek az antiszensz, míg az alsók a szensz orientációban beépített szekvenciáknak felelnek meg. Előbbi esetben a várt fragment mérete 605 bp (PAV Sal2B for + Nos-T 2028 rev primerpár), utóbbinál 514 bp (PAV Sal2S for + PAV Sal2S rev primerpár). Minták: a gél két szélő zsebében MR-DNS; 1: 181-es T₀ növény; 2-5: előbbinek TDH₁ utódai; 6: 189/2-es T₀ növény; 7-10: előbbinek TDH₁ utódai; 11: pozitív kontroll (plazmid-DNS); 12-14: negatív kontrollok (desztillált víz, 1-es és 249-es T₀ növények)

18. táblázat. Molekulárisan jellemzett TDH₁ növények termésadatai

törzs sorszáma	plazmid	TDH ₁ növények termése (db szem)				törzs sorszáma	plazmid	TDH ₁ növények termése (db szem)			
		1.	2.	3.	4.			1.	2.	3.	4.
1	A	42	42	50	59	186/1	B	37	21	4	28
2		77	40	35	36	188		135	113	15	33
5/2		81	76	65	50	189/2		8	35	26	44
47		98	63	71	85	20	C	85	40	11	37
48/1		74	25	114	46	222	G	81	2	–	–
179/2	0	0	–	–	223/9	6		78	14	–	
180/2	1	12	6	–	223/10	82		23	–	–	
180/3	54	41	24	46	223/13	50		50	21	–	
180/5	0	0	0	0	227/3	25		30	93	52	
180/7	17	31	40	22	243	68		73	85	42	
181	10	15	20	38	249	48		60	99	43	

A szürke háttérrel jelölt növényekből nem tudtuk kimutatni a szensz és/vagy antiszensz orientációjú, virális eredetű célszekvenciákat.

4.2.3. BSMV-fertőzéssel szembeni rezisztencia tesztelése**4.2.3.1. A vírusátvitel hatékonyságának ellenőrzése**

Elsőként a mesterséges fertőzési rendszer működését, a vírusátvitel hatékonyságát vizsgáltuk meg vad típusú CY-45 és GK Tavasz búzák, valamint egy igen fogékony árpafajta, a Lilla kísérletbe vonásával. Négy-négy növényt egyleveles fenofázisban megfertőztünk BSMV-vel, további négy pedig ún. mock inokulált kontrollként szolgált. Három héttel később felvételeztük a tüneteket (19. táblázat). Elvárásainknak megfelelően valamennyi mock inokulált növény tünetmentes maradt, míg a BSMV-vel inokulált növényeken megjelentek a vírus által okozott tipikus kórképek: a levelekkel párhuzamos, hosszú, kifakult csíkok. A legerősebb tünetek a Lilla árpafajta egyedein mutatkoztak. Némileg kevesebb kórképet észleltünk a két búzatorzsön, ugyanakkor enyhe érzékenységbeli különbség is látható volt, ugyanis a GK Tavasz növényeken alacsonyabb tüneti pontokat regisztráltunk, mint a CY-45 esetében.

A kísérleti növényeket tovább neveltük. Korábbi megfigyeléseink megerősítést nyertek, mivel a későbbiekben kifejlődött leveleken még kifejezettebben jelentek meg a tünetek. A mock inokulált növényekhez képest a vírussal fertőzöttek fejlettségben elmaradtak, jelentősen alacsonyabbak voltak és egyáltalán nem neveltek oldalhajtásokat. A betakarított kalászkok egy részét a 21. ábrán mutatjuk

be. Egyértelműen látszik a vírusfertőzöttség drasztikus hatása a Lilla árpafajtán: a kalászkák annyira fejletlenek maradtak, hogy a toklászszálkák szinte közvetlenül a kalászorsóról eredtek, ami ugyancsak fejletlen, alig felismerhető volt. Termést egyetlen árpanövény sem hozott. Nem ennyire látványos, mégis határozott depressziót észleltünk a két búzánál: a kalászhossz felére redukálódott a mock inokulált kontrollhoz viszonyítva. A GK Tavasz növények közül csak kettő, míg a CY-45 esetében mindössze egy növény adott termést.

Fertőzési módszerünkkel tehát a BSMV hatékonyan átvihető volt mind CY-45, mind pedig GK Tavasz búzatörzsekre, ezáltal lehetővé vált az A- illetve a G-plazmidot hordozó növények rezisztenciájának objektív tesztelése.

19. táblázat. Vírustünetek felvételezése három héttel a fertőzés után az inokulált levél feletti második lomblevelen ötfokozatú skála segítségével a vírusátvitel hatékonyságának megállapítására (1 = tünetmentes; 5 = igen erősen tünetes levél)

	mock inokulált növények					vírussal inokulált növények				
	1.	2.	3.	4.	átlag	1.	2.	3.	4.	átlag
Lilla	1	1	1	1	1,00	3	4	4	3	3,50
CY-45	1	1	1	1	1,00	3	2	3	3	2,75
GK Tavasz	1	1	1	1	1,00	2	2	3	3	2,50



21. ábra. A vírusátvitel hatékonyságának tesztelésére használt növények kalásza
 1, 3 és 5: mock inokulált Lilla, CY-45 és GK Tavasz;
 2, 4 és 6: BSMV-vel inokulált Lilla, CY-45 és GK Tavasz.
 A mérőlécs skálája centiméterben értendő

4.2.3.2. Vizsgálatok a tenyészidőszakban

Kísérletünkben a G-vektort expresszázó TDH törzsekből jelöltünk ki néhányat, amelyek ellenállóságát bizonyítani kívántuk. Ez a konstrukció tartalmazta ugyan a BSMV-, a BYDV-, a WDV- és a WSMV-specifikus fordítva ismétlődő szekvenciákat is, de módszertani lehetőségeink miatt csak a BSMV-vel szembeni rezisztenciát teszteltük. Azért esett választásunk a 243-as és a 249-es T₀ növény dihaploid utódaira, mert így mindkét donor búza genotípuson vizsgálhattuk az RNS-interferencia révén kialakuló rezisztencia mértékét. Azokat a törzseket jelöltük ki a kísérlethez, amelyekből a legnagyobb vetőmagtartalmúkat tudtuk képezni. Ezek: 243-1, 243-3, 243-4 (GK Tavasz eredetűek), illetve 249-3, 249-4, 249-8 (CY-45 eredetűek).

A vetéstől számított 12-18. hét közötti időszakban hetente felvételeztük a kórképeket (20. táblázat). Mock inokulált növényeink végig tünetmentesek maradtak, vagyis a BSMV-vel inokulált növényeken észlelt változások csakis a mesterséges fertőzés következtében alakulhattak ki. Adataink megerősítették az előzetes vizsgálat eredményeit: a két vad típusú búza levelein igen erős tünetek jelentkeztek. GK Tavasz esetében az első megfigyelés alkalmával a 16 növény átlagos pontszáma 1,75 volt, majd fokozatosan romlott, s a 18. héten már 4,44-es értéket rögzítettünk. A CY-45 egyedek átlaga 1,81 volt a 12. héten, míg a 18. héten 4,69. A tünetek megjelenésének, erősödésének dinamikája a két búzatörzsön hasonló volt. A növények kétharmadán már az első felvételezés során találtunk gyenge vagy közepes fertőzöttségre utaló jeleket, és csak a populáció egyharmada bizonyult tünetmentesnek. A következő 3-4 hétben egyre markánsabb tünetek jelentkeztek, majd a 15-18. héten lelassult, illetve megállt a tünetek további erősödése. A növények többségén a legerősebb kórképek fejlődtek ki, közepesnél gyengébb megbetegedést pedig sehol sem tapasztaltunk a megfigyelési időszak végére. A kórképek a későbbiekben kifejlődött leveleken is megjelentek és a teljes érés, vagyis a szeneszencia kezdetéig jól szemrevételelezhetőek voltak.

A fentiekől igen eltérő eredményeket kaptunk a TDH búzatörzsek vizsgálatakor. Minden növény tünetmentes volt a kísérlet kezdetén és 85 %-uk az is maradt a megfigyelési periódus végéig. Néhány egyed (10 db GK Tavasz eredetű és 4 db CY-45 eredetű), gyenge vagy közepes elváltozásokat találtunk, ennél erősebb tünetek azonban egyáltalán nem alakultak ki. A kórképek felerősödésének dinamikája hasonló volt a vad típusú kontrollknál leírtakhoz. A 18. héten megfigyelt átlagos pontszámok 1,06 és 1,44 között alakultak, ami jelentősen alacsonyabb a kontroll genotípusokhoz képest. Szembetűnő a különbség, ha a BSMV-vel inokulált növények adatait saját mock inokulált kontrolljaikhoz viszonyítjuk: a GK Tavasz és a CY-45 esetében is az átlagos tüneti pontszám 4,00 fölé emelkedett a vetés utáni 18. hétre, míg a TDH törzsek pontszámai alig haladták meg a mock inokulált kontrollok átlagadatait (20. táblázat). Azokon a növényeken, amelyeken kórképeket észleltünk, a vizsgálati szakasz lezárása után is megfigyelhetőek voltak a tünetek – ide értve az újonnan kifejlődött leveleket is. A tünetmentes egyedek a felvételezési periódust követően is egészségesek maradtak.

Párhuzamosan a fenti megfigyelésekkel megmértük a vírustünetek felvételezésére kiválasztott levelek SPAD-értékeit, amelyek a fotoszintetikus aktivitást fejezik ki. Eredményeinket a 22. ábrán mutatjuk be grafikus formában, ahol minden adatpont 16 mérés átlagának felel meg. A SPAD értékek alakulása jól követte a tünetek felvételezésekor rögzített pontszámokat, vagyis ahol erősebb tünetek, kifakult mozaikcsíkok jelentek meg a levéllemezen, ott a fotoszintézis is csökkent. A mock inokulált vad típusú és TDH növények SPAD-értéke a hét hetes periódus alatt végig 40 körül alakult és minimális ingadozást mutatott. A BSMV-vel inokulált vad típusú búzák klorofilltartalma azonban már a 12. héten alacsonyabb volt a mock inokulált kontrollokhoz képest, s ez a különbség a 18. hétre még kifejezettebbé vált: GK Tavasz esetében 17-re, CY-45-nél 16,1-re esett vissza a SPAD-érték, ami 48 %-os, illetve 49 %-os csökkenésnek felel meg. Ezzel szemben a vírussal inokulált TDH búzatörzsek SPAD-értéke a saját mock inokulált kontrolljukhoz viszonyítva nem, vagy kissé változott, kivéve a 243-1 és a 243-4 törzseket, ahol közepes (17 %-os, illetve 27 %-os) csökkenést észleltünk.

Kísérletünk statisztikai kiértékelését kétváltozós lineáris regresszióanalízissel végeztük. A kiszámított korrelációs koefficienseket (r) és a regressziós egyenleteket a 22. ábra grafikonjainál közöljük. Az idő és a klorofilltartalom negatív összefüggését kaptuk, ami megfelelt hipotézisünknek. A mock inokulált és a vírussal inokulált növények regressziós koefficiensei (b) különbségének szignifikanciavizsgálata t -próbával történt, amelyet a 21/a. táblázatban adunk közre. Mindkét vad típusú kontrollnál $P = 0,1\%$ hibavalószínűségi szinten szignifikánsan alacsonyabb volt a vírussal inokulált egyedek b -értéke, mint a mock inokuláltaké. $P = 1\%$ szinten a 243-1 és a 243-4 törzseknél mutatkozott szignifikáns különbség, míg $P = 5\%$ szinten a 243-3 és a 249-3 törzseknél. A 249-4 és a 249-8 törzseknél nem volt szignifikáns eltérés a regressziós koefficiensek között. Ugyanakkor a 21/b. táblázatban látszik, hogy ha egy adott TDH törzs és a vad típusú kontroll vírussal inokulált növényeinek b -értékeit hasonlítjuk egymáshoz, akkor a t -próba szerint valamennyi TDH törzs szignifikánsan különbözött saját vad típusú kontrolljától. A 243-4 törzsnél $P = 5\%$ hibavalószínűségi szinten volt szignifikáns különbség, a többi törzsnél pedig $P = 1\%$ szinten. Tehát a BSMV-inokuláció hatására a regressziós koefficiens értéke szignifikánsan kevésbé csökkent le a TDH törzseknél, mint a GK Tavasz, illetve a CY-45 esetében.

Megfigyelési periódusunk végén minden genotípusból véletlenszerűen kiválasztottunk egy mock inokulált és négy vírussal inokulált növényt (ezeket a 20. táblázatban már jeleztük), amelyeknek eltávolítottuk az eddigi vizsgálatok tárgyát képező leveleit, és meghatároztuk azok BSMV-koncentrációját DAS-ELISA módszerrel. A teszt során a fertőzési forrásként alkalmazott árpanövény levelét használtuk pozitív kontrollként. A megvizsgált leveleket és a kapott eredményeket a 23. ábrán mutatjuk be. Az extinkciós értékek és a tapasztalt BSMV-tünetek teljes összhangban voltak egymással. Hipotézisünknek megfelelően valamennyi mock inokulált növény fertőzésmentesnek bizonyult, mivel esetükben 0,7-nél kisebb értékeket (0,367 – 0,533) detektáltunk. A pozitív kontrollként alkalmazott árpalevél

20. táblázat. BSMV tünetek felvételezése ötfokozatú skála segítségével (1 = tünetmentes; 5 = igen erősen tünetes) 2014.04.10-14. hét között az inokuláció utáni 12-18. héten az inokulált levél feletti negyedik lomblevélen

	hetek	mock inokulált növények					vírussal inokulált növények																
		1.	2.	3.	4.	átlag	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	átlag
GK Tavasz	12.	1	1	1	1	1,00	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1,75
	13.	1	1	1	1	1,00	2	3	4	2	2	1	1	2	2	3	3	3	2	3	3	2	2,38
	14.	1	1	1	1	1,00	2	4	4	3	3	2	3	3	4	4	4	3	4	4	4	3	3,38
	15.	1	1	1	1	1,00	3	5	5	4	4	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4,44
	16.	1	1	1	1	1,00	3	5	5	4	4	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4,44
	17.	1	1	1	1	1,00	3	5	5	4	4	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4,44
	18.	1	1	1	1	1,00	3	5	5	4	4	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	4,44
243-1	12.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	13.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,13
	14.	1	1	1	1	1,00	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,25
	15.	1	1	1	1	1,00	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,25
	16.	1	1	1	1	1,00	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,25
	17.	1	1	1	1	1,00	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,25
	18.	1	1	1	1	1,00	1	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,25
243-3	12.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	13.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	14.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,13
	15.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,13
	16.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,13
	17.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,13
	18.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,13
243-4	12.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	13.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1,19
	14.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1,31
	15.	1	1	1	1	1,00	1	2	2	1	3	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1,44
	16.	1	1	1	1	1,00	1	2	2	1	3	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1,44
	17.	1	1	1	1	1,00	1	2	2	1	3	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1,44
	18.	1	1	1	1	1,00	1	2	2	1	3	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1,44

Folytatás a következő oldalon.

	hetek	mock inokulált növények					vírussal inokulált növények																	
		1.	2.	3.	4.	átlag	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	átlag	
CY-45	12.	1	1	1	1	1,00	2	2	2	1	2	3	1	1	1	3	2	2	1	2	2	2	2	1,81
	13.	1	1	1	1	1,00	3	2	3	2	3	4	2	3	1	3	3	3	2	2	2	2	3	2,56
	14.	1	1	1	1	1,00	4	3	3	3	4	4	3	3	3	4	3	4	2	3	3	3	3	3,25
	15.	1	1	1	1	1,00	5	4	5	4	5	5	4	5	4	5	5	5	4	5	4	4	4	4,56
	16.	1	1	1	1	1,00	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5	4	5	4	4	4	4,69
	17.	1	1	1	1	1,00	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5	4	5	4	4	4	4,69
	18.	1	1	1	1	1,00	5	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5	5	4	5	4	4	4	4,69
249-3	12.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	13.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,06
	14.	1	1	1	1	1,00	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,13
	15.	1	1	1	1	1,00	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,13
	16.	1	1	1	1	1,00	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,13
	17.	1	1	1	1	1,00	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,13
	18.	1	1	1	1	1,00	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1,13
249-4	12.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	13.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	14.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	15.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	16.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	17.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	18.	1	1	1	1	1,00	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
249-8	12.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	13.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	14.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00
	15.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	16.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	17.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06
	18.	1	1	1	1	1,00	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,06

Szürke háttérrel jelöltük azokat a véletlenszerűen kiválasztott növényeket, amelyek vírusfertőzöttségét a 18. héten DAS-ELISA módszerrel is meghatároztuk.

► **22. ábra** (79. oldal). A vírustünetek felvételezésére kiválasztott levelek SPAD-értéke (fotoszintetikus aktivitása) a vetés utáni 12-18. héten.

A független változó a heteknek felel meg, a függő változó pedig a SPAD-értékeknek minden grafikonon. Az adatpontok 16 mérés átlagát fejezik ki.

Színek: kék – mock inokulált; piros – BSMV-vel inokulált növények

21/a. táblázat. Mock inokulált növények (mi) és vírussal inokulált növények (vi) regressziós koefficiensei (b) különbségének szignifikanciavizsgálata t -próbával. A kritikus t -értékek: $t_{0,1\%} = 4,59$; $t_{1\%} = 3,17$; $t_{5\%} = 2,23$; $t_{10\%} = 1,81$

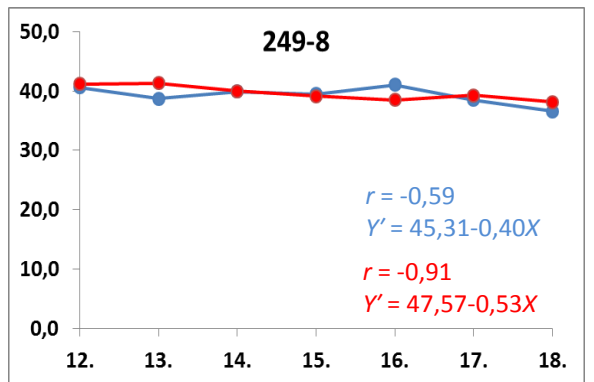
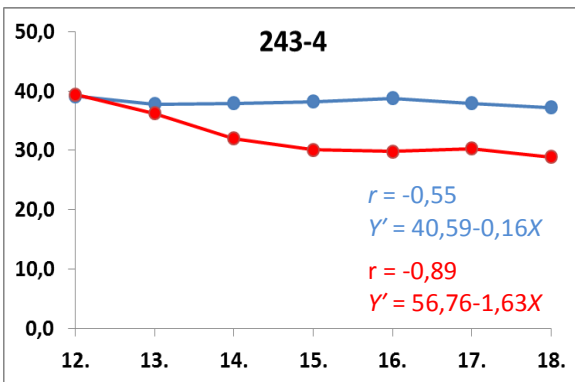
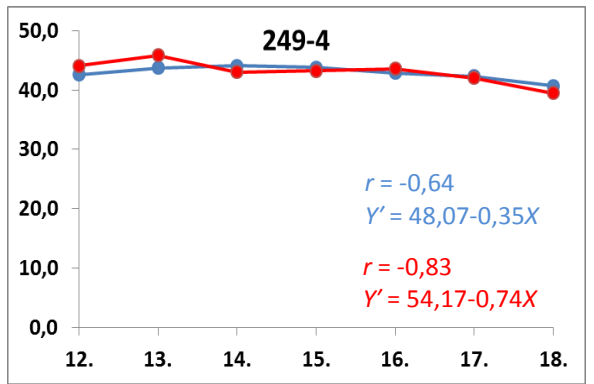
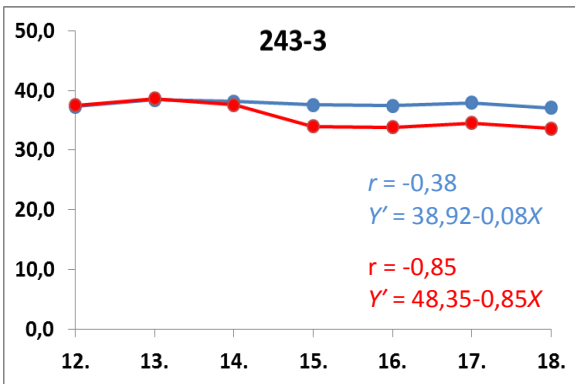
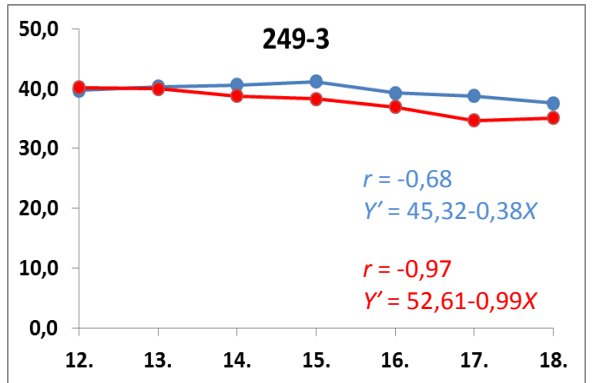
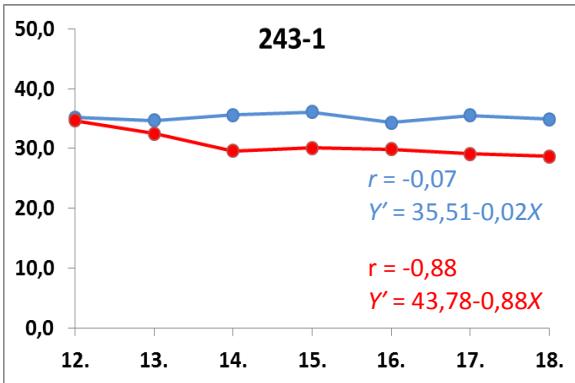
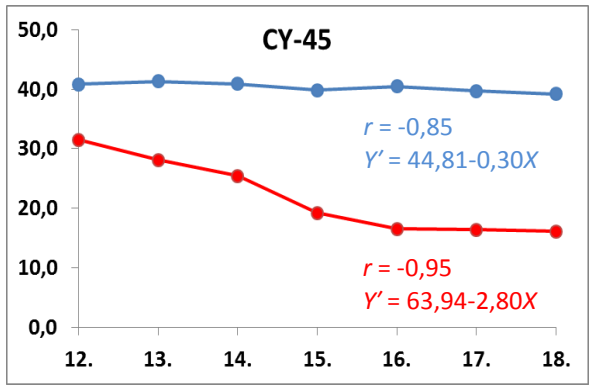
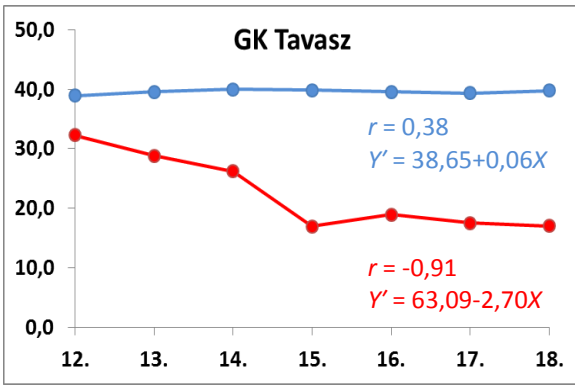
	$b_1(mi)$	$b_2(vi)$	$t_{számított}$		$b_1(mi)$	$b_2(vi)$	$t_{számított}$
GK Tavasz	0,06	-2,70	4,96	CY-45	-0,30	-2,80	6,04
243-1	-0,02	-0,88	3,41	249-3	-0,38	-0,99	2,81
243-3	-0,08	-0,85	3,07	249-4	-0,35	-0,74	1,35
243-4	-0,16	-1,63	3,86	249-8	-0,40	-0,53	0,46

21/b. táblázat. Vírussal inokulált TDH törzsek és a vad típusú kontroll regressziós koefficiensei (b_1 , illetve b_2) különbségének szignifikanciavizsgálata t -próbával. A kritikus t -értékek megegyeznek a fent leírtakkal

	b_1	$b_2(GK\ Tavasz)$	$t_{számított}$		b_1	$b_2(CY-45)$	$t_{számított}$
243-1	-0,88	-2,70	3,67	249-3	-0,99	-2,80	5,64
243-3	-0,85	-2,70	3,66	249-4	-0,74	-2,80	5,28
243-4	-1,63	-2,70	2,46	249-8	-0,53	-2,80	6,19

víruskoncentrációja igen magas, 1,189 volt. Mindkét vad típusú búza egyedei erősen fertőzöttek bizonyultak, hiszen víruskoncentrációjuk 1,000 fölött alakult, sőt néhány esetben a pozitív kontrollként használt árpát is meghaladta. A TDH búzatörzsek esetében egész más eredményt kaptunk. A CY-45 eredetűek közül egy sem bizonyult fertőzöttnek, sőt néhány minta még a saját mock inokulált kontrolljának extinkciós értékét sem érte el. A GK Tavasz eredetűek közül a 243-3 törzs egyetlen egyede sem volt fertőzött, ugyanakkor a 243-1 törzs egyik növényénél 0,882-es értéket kaptunk, ami fertőzésre utal. A 243-4 törzs 2 növénye átlépte a 0,7-es határértéket, egy harmadiknál pedig 0,662-t mértünk, ami a fertőzöttség szintjét alulról közelíti (23. ábra).

Eddigi eredményeink azt sugallták, hogy a bejuttatott DNS-szekvenciák képesek indukálni az RNS-interferenciát, hiszen a megvizsgált populációban számos törzs szignifikánsan eltérő választ adott a BSMV-inokulációra, mint a kontrollok. Vizsgálatainkat azonban tovább folytattuk és magfogásig neveltük növényeinket, hogy a betakarítás idején további tulajdonságok összehasonlításával még több információt szerezzünk a kísérleti populáció vírusrezisztenciájáról.



- **23. ábra** (81. oldal). A rezisztenciateszt során vizsgált búzatörzsek levélmintái. Levelek balról jobbra (mindegyik részletábrán): *FF* – a fertőzési forrásként használt árpa, mint pozitív kontroll; *M* – mock inokulált növény, mint negatív kontroll; *i-iv* – az árpa leveléből nyert emulzióval inokulált TDH növények. A levelek alatti számok a DAS-ELISA vizsgálat során kapott extinkciós értékeknek felelnek meg. A könnyebb összehasonlíthatóság miatt az eredeti számok 1000-szeresét közöljük

4.2.3.3. Vizsgálatok a betakarításkor

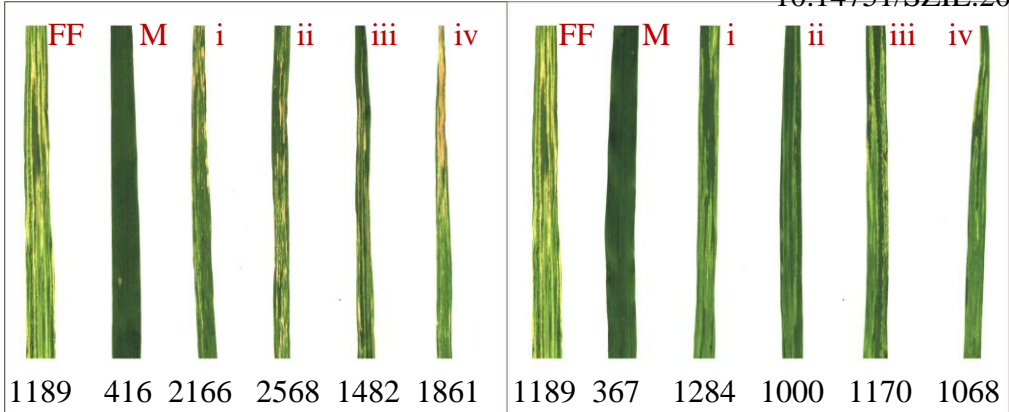
Négy agronómiai paraméter: a növénymagasság, a kalászhossz, az ezerszemtömeg és a termés alakulását vizsgáltuk meg a BSMV-vel történt inokuláció hatására. Adatainkat a 22. táblázatban közöljük.

Közvetlenül a betakarítás előtt felvételeztük a növények magasságát, amelyet a 24. ábrán szemléltetünk. A mock inokulált vad típusú GK Tavasz és CY-45 növények 40-50 cm közötti magasságot értek el. Ezzel szemben a BSMV-vel történt inokuláció hatására a növények visszamaradtak a fejlődésben és mindössze 20-30 cm közötti magasságadatokat tudunk rögzíteni. A vírussal inokulált TDH törzsek átlagos fejlettsége és magassága hasonlóképpen alakult a vad típusú mock inokulált kontrolloknál leírtakkal. Megjegyezzük azonban, hogy a 18. héten tünetesnek, illetve fertőzöttnek elkönyvelt egyedeknél a betakarításkor is észleltük a kezelés hatását, hiszen ezek a növények csoportátlagukhoz képest alacsonyabbak voltak – jöllehet közel sem annyira, mint a vírussal inokulált vad típusú kontrollok.

Cséplés előtt rögzítettük a betakarított kalászok hosszát. Amint a 25. ábrán is látszik, a fordítva ismétlődő szekvenciákat nem tartalmazó GK Tavasz és CY-45 növényeknél a kalászhossz 55 mm körüli értékről 30 mm-re esett vissza a BSMV-vel történt inokuláció hatására. A TDH törzsek esetében is megfigyeltünk némi kalászhossz-csökkenést, de korántsem ekkorát. Itt ugyanis 12 mm-nél nagyobb különbséget nem találtunk egy adott törzs mock inokulált és vírussal inokulált változata között – eltekintve a néhány beteg növénytől, ahol 35 mm körüli adatokat kaptunk. A kísérleti populációt képező 160 növényből 147 csak egy kalászt nevelt, a többi pedig kettőt. A két kalászt képező növények eloszlása normális volt: éppúgy előfordultak a vad típusú búzáknál, mint a TDH törzseknél.

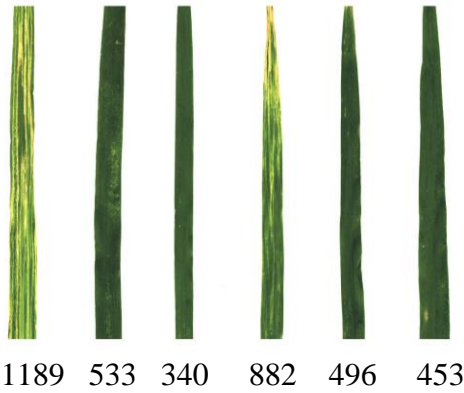
A kalászok kicséplése után megmértük a növények termésének tömegét. A mock inokulált vad típusú GK Tavasz növények átlagtermése 539 mg volt, ami a BSMV-inokuláció hatására drasztikusan lecsökkent 60 mg alá. Ennek oka, hogy a 16 növény közül 6 teljesen sterilnek bizonyult, s a magokat fejlesztő egyedek termése sem haladta meg a 200 mg-ot. A GK Tavasz eredetű mock inokulált TDH törzsek átlagos termése 500 mg körül alakult, míg a vírussal inokuláltaknál 400 mg körüli átlagadatokat kaptunk. A 243-1 és a 243-4 törzsek egyedei között – ahol néhány fertőzött növényt találtunk a szerológiai vizsgálatok során – előfordult 200 mg

GK TAVASZ



CY-45

243-1



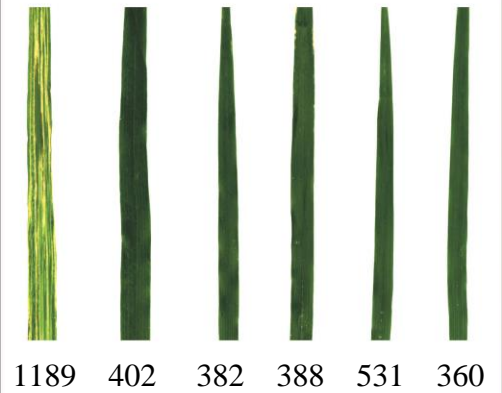
249-3



243-3



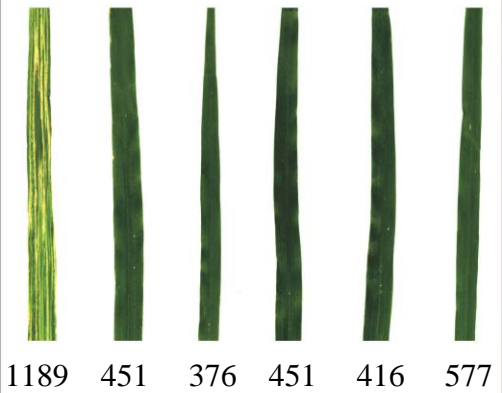
249-4



243-4



249-8



22. táblázat. BSMV-inokuláció hatása a vad típusú kontroll és a TDH növények agronómiai paramétereire

		NÖVÉNYMAGASSÁG (cm)								KALÁSZHOSSZ * (mm)												
		sorszám	GK Tavasz				CY-45				sorszám	GK Tavasz				CY-45						
			243-1	243-3	243-4	249-3	249-4	249-8		243-1	243-3	243-4	249-3	249-4	249-8		243-1	243-3	243-4	249-3	249-4	249-8
mock inokulált	1.	42	34	44	50	36	40	43	42	1.	48	45	50	57	51	50	67	63				
	2.	41	44	47	48	47	45	44	46	2.	51	50	54	60	66	60	58	79				
	3.	50	44	39	40	42	48	51	44	3.	60	48	48	55	55	54	55	51				
	4.	41	45	54	43	47	45	40	41	4.	54	53	51	49	61	87	61	59				
vírussal inokulált	1.	30	37	45	47	18	44	44	39	1.	43	45	54	54	25	65	44	47				
	2.	17	34	44	44	19	46	45	42	2.	25	47	55	51	33	75	61	54				
	3.	25	28	40	44	16	41	41	40	3.	39	35	46	51	32	61	61	51				
	4.	16	44	31	41	28	47	42	25	4.	38	52	40	46	38	56	42	38				
	5.	26	46	43	24	20	33	33	39	5.	32	55	52	34	40	52	53	49				
	6.	31	36	40	37	23	38	34	43	6.	42	44	51	51	38	67	50	50				
	7.	28	40	53	51	26	44	43	45	7.	39	46	55	72	38	51	43	51				
	8.	27	41	30	52	23	40	38	45	8.	43	50	50	63	30	48	48	51				
	9.	17	39	54	32	26	40	47	47	9.	28	46	69	35	39	48	47	48				
	10.	22	42	41	45	29	39	38	41	10.	34	51	50	49	44	60	58	67				
	11.	18	45	46	37	29	51	42	38	11.	29	61	46	50	25	62	42	48				
	12.	15	41	35	56	22	38	38	41	12.	30	50	48	71	34	50	53	47				
	13.	17	39	43	52	25	38	49	38	13.	37	45	54	58	45	49	49	43				
	14.	22	35	46	45	26	38	38	46	14.	29	51	53	50	36	51	58	50				
	15.	20	41	56	34	30	41	44	40	15.	31	50	65	52	40	47	44	66				
	16.	31	39	33	40	32	38	36	41	16.	35	47	46	43	40	49	56	63				
		TERMÉS (mg)								EZERSZEMTÖMEG (g)												
mock inokulált	1.	519	379	435	503	380	299	389	561	1.	35	32	29	25	36	37	39	31				
	2.	456	671	636	775	426	350	476	412	2.	30	39	30	31	33	35	38	33				
	3.	843	404	403	421	494	446	510	403	3.	40	31	31	30	35	32	30	31				
	4.	338	561	552	325	528	470	421	366	4.	31	35	32	30	31	39	33	34				
vírussal inokulált	1.	196	414	467	315	0	757	522	369	1.	28	28	36	28	0	45	31	33				
	2.	0	319	423	387	0	440	466	414	2.	0	22	30	23	0	24	37	40				
	3.	92	89	305	315	0	336	314	402	3.	23	22	28	25	0	26	27	32				
	4.	113	579	197	375	0	266	454	136	4.	19	24	28	35	0	30	42	31				
	5.	59	455	360	194	0	200	348	576	5.	20	24	30	19	0	33	30	34				
	6.	170	315	344	396	0	886	361	520	6.	34	29	26	26	0	40	32	37				
	7.	35	417	478	653	62	343	459	449	7.	12	28	32	41	31	31	38	41				
	8.	85	368	215	612	27	268	326	432	8.	28	33	24	34	27	38	31	28				
	9.	0	292	760	164	109	236	545	417	9.	0	32	39	21	27	34	39	33				
	10.	0	347	361	379	0	336	358	399	10.	0	23	33	31	0	34	32	31				
	11.	0	643	434	293	0	656	335	406	11.	0	34	26	23	0	29	38	39				
	12.	0	339	246	648	26	265	387	385	12.	0	31	31	35	26	33	28	31				
	13.	0	410	381	504	34	233	348	410	13.	0	29	29	27	17	33	29	29				
	14.	55	446	436	365	32	412	460	465	14.	28	34	29	30	11	32	39	29				
	15.	27	463	800	368	36	195	476	392	15.	27	36	33	28	12	32	33	40				
	16.	118	448	232	268	68	286	307	311	16.	30	34	29	34	13	24	27	32				

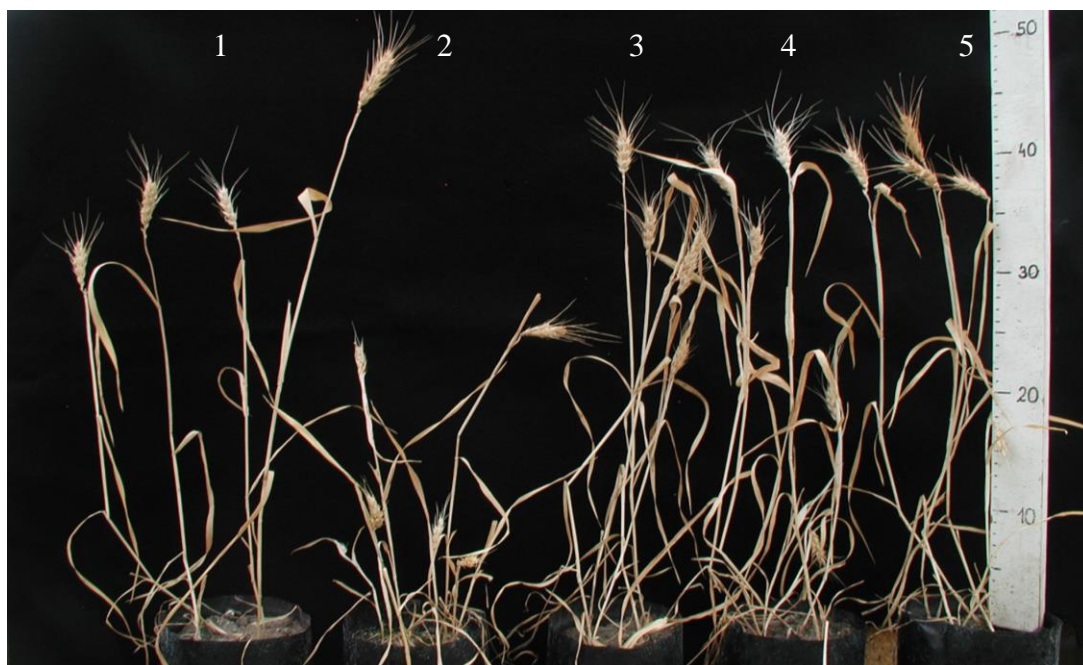
* Több kalász esetén a főkalász hossza.

alatti terméseredmény is. A CY-45 átlagtermése 457 mg volt a kísérletben, s ez a BSMV hatására még a GK Tavaszhoz képest is nagyobb arányban lecsökkent: 25 mg alatti átlagértéket mértünk, amiben közrejátszott az is, hogy itt kettővel több volt a steril növények száma, és a fertiliseknél is szinte csak 100 mg alatti értékeket kaptunk. A CY-45 eredetű TDH törzseknél mind a mock inokulált, mind a vírussal inokulált csoport átlagos termése 400 mg körül alakult. Az előző bekezdésben említést tettünk a több kalászt fejlesztő növényekről. A termésadatokba a második kalászokat is beszámítottuk, ezek azonban rendszerint gyengén termékenyültek és mindössze 0-5 szemet tartalmaztak.

A terméseredmények alapján kiszámítottuk a növények ezerszemtömegét, amely közvetve a termés minőségére is utalt. Általánosságban a termésnél tapasztalt tendenciák érvényesültek ennél a mutatónál is. A vírussal történt inokuláció hatására a TDH törzsek átlagos ezerszemtömege csak 1-5 g-mal csökkent a mock inokuláltakhoz képest, míg a vad típusú GK Tavasz átlagos ezerszemtömege 18 g-mal, a CY-45 búzáé pedig 23 g-mal volt alacsonyabb a kontrollokhoz viszonyítva. Adatainkat statisztikailag is elemeztük, hogy választ adhassunk a következő kérdésekre:

1. Szignifikáns-e a különbség a mock inokulált növények csoportjában a vad típusú búza (kontroll) és TDH törzsei között? Hipotézisünk szerint nem az.
2. Szignifikáns-e a különbség a vírussal inokulált növények csoportjában a vad típusú búza (kontroll) és TDH törzsei között? Hipotézisünk szerint igen.
3. Szignifikáns-e a különbség a genotípusokon belül a mock inokulált (kontroll) és a vírussal inokulált növények között? Hipotézisünk szerint a vad típusú búzáknál igen, a TDH törzseknél nem.

Első két kérdésünkre egytényezős varianciaanalízissel adtunk választ, amelynek eredményét a 23. táblázatban közöljük. Hipotéziseink $P = 5\%$ -os hibavalószínűségi szinten valónak bizonyultak, mivel a mock inokulált csoportban a szignifikáns differencia értéke minden agronómiai paraméter esetében nagyobb volt, mint a kapott adatok közötti különbség. Tehát sem a GK Tavasz, sem a CY-45 elemzett tulajdonságai nem változtak meg a G-plazmida bejuttatott fordítva ismétlődő szekvenciák hatására. Másrészt igazoltuk, hogy a BSMV-vel inokulált TDH törzsek és vad típusú búzáknál közötti eltérések szignifikánsak voltak, tehát a kontrollokhoz képest a TDH törzsek statisztikailag is eltérő reakciókat mutattak. Harmadik kérdésünkre középérték-analízissel adtunk választ, ezt a 24. táblázatban részletezzük. Mind a GK Tavasz, mind a CY-45 genotípuson belül a mock inokulált csoport átlaga valóban szignifikánsan magasabb volt a vírussal inokulált csoport átlagától minden vizsgált tulajdonság vonatkozásában, tehát a BSMV statisztikailag igazolható leromlást okozott. Ugyanakkor a TDH törzseknél nem kaptunk szignifikáns eltérést a kontroll és a kezelt csoportok átlagadatai között. Két kivételt találtunk ez alól: a 249-4 és a 249-8 törzsek kalászhossza szignifikáns csökkenést mutatott a BSMV hatására. A többi paraméterben – közöttük a termésben, mint legfontosabb tényezőben – jelentkező változás azonban nem volt szignifikáns, tehát csupán kísérleti hibának tekinthető.



24. ábra. A BSMV-rezisztenciateszt során vizsgált búzatörzsek véletlenszerűen kiválasztott egyedei betakarítás előtt.

- 1: mock inokulált vad típusú CY-45 (pozitív kontroll);
 2: vírussal inokulált vad típusú CY-45 (negatív kontroll);
 3-5: vírussal inokulált TDH növények (249-3, 249-4, 249-8).
 A mérőlécs skálája centiméterben értendő



25. ábra. A BSMV-rezisztenciateszt során vizsgált búzatörzsek véletlenszerűen kiválasztott kalászhai a betakarítás után.

- Páratlan számok:* mock inokulált kontroll növények;
páros számok: vírussal inokulált növények;
 1-2: vad típusú GK Tavasz; 3-4: 243-1; 5-6: 243-3; 7-8: 243-4.
 A mérőlécs skálája centiméterben értendő

23. táblázat. Agronómiai paraméterek változásának elemzése egytényezős varianciaanalízissel $P = 5\%$ -os hibavalószínűségi szinten. Minden esetben X_1 a mock inokulált, X_2 pedig a BSMV-vel inokulált növények átlagának felel meg. Szignifikáns eltérésre a kis betűk változása utal

<i>N ö v é n y m a g a s s á g (cm)</i>						
	X_1		X_2			
GK Tavasz	43,50	a	22,63	b	CY-45	43,00 a 24,50 b
243-1	41,75	a	39,19	a	249-3	44,50 a 41,00 a
243-3	46,00	a	42,50	a	249-4	44,50 a 40,75 a
243-4	45,25	a	42,56	a	249-8	43,25 a 40,63 a
$SzD_{5\%} =$	7,94		4,80		$SzD_{5\%} =$	6,21 3,30

<i>K a l á s z h o s s z * (mm)</i>						
	X_1		X_2			
GK Tavasz	53,25	a	34,63	b	CY-45	58,25 a 36,06 b
243-1	49,00	a	48,44	a	249-3	62,75 a 55,69 a
243-3	50,75	a	52,13	a	249-4	60,25 a 50,56 a
243-4	55,25	a	51,88	a	249-8	63,00 a 51,44 a
$SzD_{5\%} =$	6,23		5,32		$SzD_{5\%} =$	17,00 5,14

<i>T e r m é s (mg)</i>						
	X_1		X_2			
GK Tavasz	539,00	a	59,38	b	CY-45	457,00 a 24,63 b
243-1	503,75	a	396,50	a	249-3	391,25 a 382,19 a
243-3	506,50	a	402,44	a	249-4	449,00 a 404,13 a
243-4	506,00	a	389,75	a	249-8	435,50 a 405,19 a
$SzD_{5\%} =$	260,95		94,21		$SzD_{5\%} =$	112,34 85,57

<i>E z e r s z e m t ö m e g (g)</i>						
	X_1		X_2			
GK Tavasz	34,00	a	15,57	b	CY-45	33,75 a 10,25 b
243-1	34,25	a	28,94	a	249-3	35,75 a 32,38 a
243-3	30,50	a	30,19	a	249-4	35,00 a 33,31 a
243-4	29,00	a	28,75	a	249-8	32,25 a 33,75 a
$SzD_{5\%} =$	5,03		5,62		$SzD_{5\%} =$	4,50 5,18

* Több kalász esetén a főkalász hossza.

24. táblázat. Agronómiai paraméterek változásának elemzése középérték-analízissel $P = 5\%$ -os hibavalószínűségi szinten. Minden esetben X_1 a mock inokulált növények középértékének felel meg, ahol az adatok száma $n_1 = 4$; X_2 pedig a BSMV-vel inokulált növények középértéke, ahol az adatok száma $n_2 = 16$. A kritikus t -érték: $t_{5\%} = 2,10$. Az aláhúzással jelölt esetekben a vizsgált csoportok szórásnégyzete legalább háromszoros különbséget mutatott, ezért a számított t -értéket nem a táblázati t -értékhez, hanem a szintén számított t' -értékhez viszonyítottuk. Az SzD-értéket csak akkor számítottuk ki, ha a t -próba szignifikáns különbséget mutatott a két középérték között

	X_1	X_2	t	SzD _{5%}	X_1	X_2	t	SzD _{5%}
	<i>N ö v é n y m a g a s s á g (cm)</i>				<i>K a l á s z h o s s z * (mm)</i>			
GK Tavasz	43,50	22,63	6,80	6,45	53,25	34,63	5,92	6,61
243-1	41,75	39,19	0,99		49,00	48,44	0,19	
243-3	46,00	42,50	0,83		50,75	52,13	<u>0,63</u>	
243-4	45,25	42,56	<u>0,86</u>		55,25	51,88	<u>0,96</u>	
CY-45	43,00	24,50	6,99	5,56	58,25	36,06	6,60	7,06
249-3	44,50	41,00	1,47		62,75	55,69	<u>0,82</u>	
249-4	44,50	40,75	1,46		60,25	50,56	2,67	7,63
249-8	43,25	40,63	<u>1,57</u>		63,00	51,44	2,40	10,11
	<i>T e r m é s (mg)</i>				<i>E z e r s z e m t ö m e g (g)</i>			
GK Tavasz	539,00	59,38	<u>4,39</u>	338,08	34,05	15,56	<u>4,55</u>	9,06
243-1	503,75	396,50	1,51		34,25	28,94	2,07	
243-3	506,50	402,44	1,14		30,50	30,19	<u>0,27</u>	
243-4	506,00	389,75	1,33		29,00	28,75	<u>0,12</u>	
CY-45	457,00	24,63	<u>12,62</u>	102,11	33,75	10,25	<u>7,38</u>	6,89
249-3	391,25	382,19	<u>0,14</u>		35,75	32,38	<u>1,66</u>	
249-4	449,00	404,13	1,08		35,00	33,31	0,64	
249-8	435,50	405,19	0,59		32,25	33,75	<u>1,14</u>	

* Több kalász esetén a főkalász hossza.

4.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel

A vírusrezisztens búzatörzsek előállításánál során a fordítva ismétlődő DNS-szekvenciák nyomon követésére kifejlesztett primereket vizsgáltuk meg abból a szempontból, hogy felhasználhatók-e szántóföldi vírusfertőzések detektálására.

A kettéválasztott levélminták egyik felét DAS-ELISA módszerrel vizsgáltuk meg (25. táblázat). A késői vetésű növényanyagban csak az Élet búzafajta egyik egyedéből mutattunk ki BYDV fertőzöttséget, míg BSMV-t, WDV-t és WSMV-t

25. táblázat. Szántóföldi vírusfertőzések kimutatása különböző vetésidejű búzamintákból kétféle módszerrel

vírus	vetés- idő	teszt	Élet	Garaboly	Kalász	Verecke	Ati	Tisza	Békés	Csillag	Petur	Hattyú	Holló	Piacos	
BSMV	okt. 11.	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nov. 3.	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BYDV	okt. 11.	ELISA	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
		PCR	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	
	nov. 3.	ELISA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WDV	okt. 11.	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	nov. 3.	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSMV	okt. 11.	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
		PCR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	nov. 3.	ELISA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- nem fertőzött
+ fertőzött

egyetlen mintában sem detektáltunk. Ezzel szemben a korai vetésű növények erősen fertőzöttek bizonyultak, itt a minták 46 %-ában fordult elő a BYDV. Mindkét vizsgált növényegyedben kimutattuk a vírust a Garaboly, Kalász és Ati fajták esetében. Csak az egyik egyed bizonyult fertőzöttnek az Élet, Verecke, Békés, Holló és Piacos fajtáknál. Mindkét vizsgált növény fertőzésmentes volt a Tisza, Csillag, Petur és Hattyú fajták esetében. WSMV fertőzést a Holló és a Piacos fajtákban mutattunk ki, WDV fertőzést csak a Piacos egyik egyedében detektáltunk, míg BSMV-t egyáltalán nem. Két fajta, a Holló és a Piacos kevert fertőzést mutatott. Előbbiben BYDV és WSMV, utóbbiban WDV, BYDV és WSMV egyaránt előfordult a mintavétel idején.

A levélminták másik felét PCR módszerrel vizsgáltuk meg (25. táblázat). A késői vetésű növényanyagnál ugyanaz az Élet minta bizonyult BYDV-vel fertőzöttnek, amelyik a szerológiai tesztben is pozitív volt. Ugyanakkor a korai vetésű növények 58 %-ában detektáltuk a fenti vírust. Mindkét vizsgált növényben kimutattuk a Garaboly, Kalász, Ati, Békés, Holló és Piacos fajták esetében. Az egyik egyed bizonyult fertőzöttnek az Élet és a Verecke fajtáknál. A Tisza, Csillag, Petur és Hattyú fajtáknál mindkét növény fertőzésmentes volt. Utóbbiak megegyeznek a szerológiai tesztben is negatív fajtákkal. A többi három vírus közül csak WSMV-t tudunk kimutatni, azt is csupán az Ati fajta esetében. BSMV és WDV egyáltalán nem fordult elő.

Mivel szinte csak a BYDV volt kimutatható a vizsgált mintákban, három hét elteltével újabb leveleket gyűjtöttünk 30 darab tünetes búzanövényről, hogy alaposabban összehasonlíthassuk tesztelési módszereinket. Mindössze két mintát találtunk, amelyekből sem szerológiai, sem molekuláris vizsgálattal nem tudtuk kimutatni a keresett négy vírus egyikét sem. DAS-ELISA tesztel BSMV-t 1, BYDV-t 16, WDV-t 7, WSMV-t pedig 6 mintában detektáltunk, míg PCR-rel BSMV-t 1, BYDV-t 19, WDV-t 13, WSMV-t pedig 14 növényből mutattunk ki. A PCR csak két esetben nem támasztotta alá a DAS-ELISA vizsgálat eredményét (egy BYDV-re és egy WSMV-re szerológiai pozitív minta nem adott jelet). Ugyanakkor megmutatkozott a molekuláris detektálás érzékenyebb volta is, mivel 19 esetben ott is ki tudtuk mutatni a fertőzést, ahol a DAS-ELISA szerint a minta negatív volt. Kevert fertőzés 8 növényben fordult elő a szerológiai módszer szerint, míg PCR szerint 17 növényben.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Széles spektrumú gyomirtószerral szembeni rezisztencia vizsgálata

A növények életciklusának legelső szakaszában jellemző környezeti kondíciók kulcsszerepet játszanak a csíranövénykori vigor kialakításában. Korábbi, nem publikált megfigyeléseink szerint a búza a PT-szerű herbicidekkel szemben épp a csírázás időszakában a legérzékenyebb. Ezért döntöttünk úgy, hogy búzaembriókat kezelünk glufozinát-ammónium különböző koncentrációival, amely hatóanyag a vad típusú növényi sejtekben toxikus PT-né alakul.

Előkísérletünkben kevesebb, mint $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ glufozinát-ammónium jelenléte a táptalajban elegendő volt a CY-45 búzatörzs csírázásának blokkolásához *in vitro*. A legelső búza transzformációs tanulmányok szerint hasonlóan alacsony koncentrációjú PTT-szerű herbicidek lehetővé tették a kalluszok hatékony szelekcióját (Vasil és mtsai, 1992).

A *bar* gént konstitutívan expresszáló „T-124” búzatörzs növénykéit életük első három hete során glufozinát-ammónium 14 különböző koncentrációjával kezeltük. A magasabb koncentrációjú kezelések szignifikáns változásokat okoztak a terméskialakító komponensekben (növényenkénti kalászszaám, kalásonkénti szemszaám, ezerszemtömeg és növényenkénti termés) a kezeletlen kontrollhoz képest. Megfigyeltük a tenyészidő alakulását is, amely az $5000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es herbicidkezelés hatására jelentősen meghosszabbodott. Valószínűleg a PAT enzim termelődésének ellenére a növények csak lassabb anyagcsere árán tudták detoxifikálni a herbicidet. Ezek a növények a talajba ültetés után megpróbálták behozni lemaradásukat, ami azonban nem a főhajtás megerősítésében, hanem számos oldalhajtás fejlesztésében mutatkozott meg. Hasonló bokrosodást észleltünk a 800 és $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es kezeléseknél is, bár itt nem tapasztaltunk tenyészidő-hosszabbodást. A szubletális dóziszú PTT stimulálta az *in vitro* hajtásregenerációt szőlő (Hébert-Soulé és mtsai, 1995), tátika (Hoshino és Mii, 1998) és rizs (Toldi és mtsai, 2000; Liu és mtsai, 2005) esetében is. Eredményeink rávilágítanak, hogy a megnövekedett ammóniumion szint abiotikus stresszt jelent a növényi sejt számára. Az apikális dominancia elve szerint a sejtosztódás gátlása a hajtáscsúcs szöveteiben erőteljes oldalhajtás-fejlődéshez vezethet. Ennek ellenére a túlélésnek ez a fajtája gyengébb kondícióval járt együtt és kizárólag rosszul termékenyült kalászsokat eredményezett.

A jól és rosszul termékenyült csoportokat azért alakítottuk ki, hogy minél részletesebb képet kapjunk a glufozinát-ammónium hatásáról. A 12. táblázat jól szemlélteti a két csoport közötti különbségeket. A kalásonkénti szemszaám csökkenését főként a kalászsok rövidülésével magyarázhatjuk, illetve közrejátszott a rosszul termékenyült kalászsoknál megfigyelt részleges vagy teljes sterilitás is. Az ezerszemtömeg mindkét csoportban hasonló intenzitással csökkent. Ennek ellenére a jól termékenyült csoportban ez nem mutatkozott meg a termésben, mivel a növényenkénti kalászszaám, valamint a kalásonkénti szemszaám stabil maradt és

ellensúlyozta az ezerszemtömeg csökkenését. A rosszul termékenyül kalászos csoportjában a $128 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es koncentrációnál már szignifikáns termésvesztést mértünk, ám ez a tendencia a $800 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es koncentrációnál megfordult és a termésértékek visszatértek a kontroll növények szignifikancia szintjére. A csökkenés az ezerszemtömeg és a kalásonkénti szemszám negatív változásainak következménye volt, míg a növekedést a növényenkénti kalásszám emelkedése okozta. A növényenkénti teljes termés hasonló fluktuációt mutatott. Bár a termés minőségét nem vizsgáltuk, de a herbicid három legmagasabb koncentrációja esetén a termésvesztést a növények kifejezetten a rosszul termékenyült kalászos megnövekedett számával kompenzálták, amelyek azonban láthatólag gyenge minőségű szemeket produkáltak.

Ha a növény pusztulását vesszük alapnak, nem tudjuk megmondani, hogy mekkora rezisztenciával rendelkeznek a „T-124” növények a kontroll CY-45 genotípushoz képest. Az $5000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es kezelést ugyanis minden egyed túlélte, így a letális dózis ismeretlen maradt. Ha a vizsgált tulajdonságokban bekövetkezett legkisebb szignifikáns változást vesszük alapul, akkor azt látjuk, hogy a $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es kezelés volt a legnagyobb, amely még semmilyen szignifikáns változást nem okozott. Véleményünk szerint azonban a növényenkénti teljes termést érdemes az összehasonlítás alapjának választani. A $64 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es herbicidkoncentráció volt a legmagasabb, amely még nem okozott szignifikáns termésnövekedést. Ebből következően a glufozinát-ammóniummal szembeni rezisztencia küszöbértékének 64 és $128 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ között kellett lennie kísérletünkben. Minthogy az előzetes vizsgálatban a herbicid letális dózisa $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -nél kevesebb volt, a „T-124” növények legalább 64-szeres rezisztenciával rendelkeznek a vad típusú CY-45 búzához képest. Ez az érték más kísérletek adatainál magasabb, vagy azokhoz hasonló. Keller és mtsai (1997) *bar*⁺ gyapot üvegházi vizsgálata kapcsán leírták, hogy a növények túléltek a $15\cdot 10^3$ ppm koncentrációjú Basta-kezelést. Ennek a herbicidnek $150 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a glufozinát-ammónium tartalma, tehát $2250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es hatóanyag-koncentrációt alkalmaztak. Gopalakrishnan és mtsai (2000) búzával végzett kísérletükben $250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es koncentrációt említettek, amelyet a növények túléltek, de a termésnövekedést nem követték nyomon. Manickavasagam és mtsai (2004) *bar*⁺ cukornádról megállapították, hogy $6000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ -es glufozinát-ammónium kezelés sem okozta a növények károsodását.

Úgy véljük, hogy a megfigyelt nagymértékű herbicidrezisztencia esetleges gyakorlati hasznosítása csak nagy körültekintéssel történhet, mert alacsony szelekciós nyomás alatt gyorsan kialakulhatnak rezisztens gyompopulációk is (Rainbolt és mtsai, 2004), túl nagy permetlé-koncentrációt alkalmazni pedig gazdaságtalan és környezetszennyező. A herbicidrezisztens gyomnövények problémaköre végigkísérte a vegyszeres gyomirtás eddigi történetét, és ez így is marad, amíg a herbicidek a gyomszabályozási program részét képezik. Triazinokkal szemben például 69, ALS-gátlókkal szemben 110, glifozáttal szemben pedig 21 gyomfajban írtak már le rezisztens biotípusokat. A problémát tetőzi, hogy ugyanaz a gyomváltozat akár több hatóanyaggal szemben is ellenállóvá válhat (Berzsenyi, 2011b). Mivel a glufozinát-ammóniummal szemben rezisztens,

köztermesztésben lévő kultúrnövények száma viszonylag kevés, a hatóanyag szelekciós időtartama pedig igen rövid, így az ellenállóvá vált gyomok száma is elenyésző. Green és Owen (2011) szerint nincs is ilyen faj, Jalaludin és mtsai (2010) viszont Malajziában egy zöldség- és egy olajpálmaültetvényben rezisztenciát mutató közönséges aszályfű (*Eleusine indica*) populációkat fedeztek fel. Avila-Garcia és Mallory-Smith (2011) pedig Oregonban három olaszperje (*Lolium perenne ssp. multiflorum*) biotípusnál – amelyek glifozát-rezisztenciája már korábban ismert volt – bizonyították a glufozinát-ammóniummal szembeni ellenállóságot. E két példán kívül 2014 februárjában más még nem szerepelt az International Survey of Herbicide Resistant Weeds adatbázisban ([http 12](http://12)).

Fentiekől függetlenül eredményeinknek nagy elméleti jelentőséget tulajdonítunk, hiszen ha a *bar* gént egyéb stresszekkel (pl. szárazság- vagy fagytürés) szemben rezisztenciát eredményező DNS-szekvenciával helyettesítjük és az jelen kísérletünkhöz hasonló mértékű ellenállóképességhez vezet, akkor minden bizonnyal sok, a mai mezőgazdaságot érzékenyen érintő probléma oldódhat meg.

5.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata

Magyarországon jelen vannak a világviszonylatban is legveszélyesebbnek tartott gabonavírusok (BSMV, BYDV, WDV, WSMV) és évjáráttól függően tetemes károkat is okozhatnak. Kísérletsorozatunkban hétféle vektormolekulával (A-G) dolgoztunk, amelyek az RNS-interferencia elvén a fenti vírusokkal, vagy azok kombinációival szemben rezisztenciát indukálhatnak. Mintegy 12250 db CY-45 eredetű és 300 db GK Tavasz eredetű búzaembriót használtunk fel biolisztikus géntranszfer céljára. A markergénre alapozott szelekciót 117 növény élte túl, azonban a patogén eredetű DNS-szekvenciák integrálódását nem minden esetben tudtuk bizonyítani. Csak a B-, C- és F-vektoroknál jelezte egyértelműen a *bar* gén a fordítva ismétlődő szekvenciák jelenlétét, a többi plazmidnál 45 % alatti megbízhatóságot tapasztaltunk. Irodalmi adatok szerint előfordulhat a vektormolekulák törése, esetleg töredékes beépülése (Altpeter és mtsai, 2005). Néhány növényünknel feltehetően ez történt az A-, D-, E- és G-plazmidokkal. Olyan esettel nem találkoztunk, hogy a virális szekvenciákra specifikus primerekkel végzett PCR és RT-PCR eltérő eredményt adott volna, tehát az integrálódott nukleinsavak expresszázódtak is. Az sem fordult elő, hogy a szensz- és antiszensz orientációban beépített DNS-szakaszok ne együttesen lettek volna jelen – tehát az RNS interferencia működésének alapjául szolgáló dsRNS-ek kialakulásának nem volt elvi akadálya. A molekuláris tesztelés során 44 pozitív növényt kaptunk, közülük 6 sterilnek bizonyult, a többről összesen 628 szemet takarítottunk be. Kísérletsorozatunkban a transzformációs gyakoriság a *bar*⁺ T₀ növényekre vonatkoztatva 1,02 %-os, míg a célgénre pozitív fertilis T₀ növényekre vonatkoztatva 0,33 %-os volt. Ez a hatékonyság a nemzetközi publikációkban közölt 0,1-5,0 %-os határok közé esik (Varshney és Altpeter, 2001; Bhalla és mtsai, 2006).

Mivel célunk volt az előállított növények kórtani tesztelése is, portoktenyésztéssel homozigótává tettük a búzatörzseket, hogy a ne kelljen számolni a tenyésztésanyag genetikai hasadásával. A kalászosokra kidolgozott haploid technika eredményes múltra tekint vissza laboratóriumunkban (Pauk és mtsai, 2003), bár transzformáns genotípusokkal még kevés tapasztalatunk volt. Nemzetközi szinten is csak néhány publikációt ismerünk, amelyekben TDH gabonanövényekről számoltak be. Baisakh és mtsai (2001) a *Rhizoctonia solani* gombafertőzéssel szemben rezisztenciát eredményező kitináz gént fejeztettek ki rizsben, és *in vitro* androgenezissel tették homozigótává a törzseket. Massiah és mtsai (2001) állítottak elő elsőként búza TDH növényeket. Kísérletükben a T₀ és a T₁ generáció is kiváló donornak bizonyult, a célgén pedig stabilan öröklődött. Aulinger és mtsai (2003) *pat* gént expresszáló kukoricák TDH változatait hozták létre, és azok utódgenerációiban sem tapasztaltak genetikai hasadást. Ezekben a tanulmányokban szelektív portoktenyésztésről nem értekeztek. Csoportunk az elsők között bizonyította, hogy az *in vitro* androgenezis során is alkalmazható a *bar* génre alapozott szelekció anélkül, hogy a zöld növény kihozatal hatékonyságát vesztené (Mihály és mtsai, 2002). A regenerációs képesség a portoktenyésztés során is köztudottan igen fajtafüggő, azonban az alkalmazott genotípusok kiválóan teljesítettek: 21 CY-45 és 1 GK Tavasz eredetű búzatörzs dihaploid változatát állítottuk elő, összesen 381 növényt. Közülük 91-ben molekuláris vizsgálatokkal leellenőriztük a fordítva ismétlődő szekvenciák expresszióját, és 97 %-ban pozitív eredményt kaptunk, tehát a markergén és a célszekvenciák együttesen öröklődtek, sikeres volt a szelekciós fázis, és maga a portoktenyésztés is.

A négy vírus szekvenciáit (G-plazmidot) hordozó TDH búzatörzsek közül a 243-as és a 249-es BSMV-vel szembeni rezisztenciáját mesterséges inokulációval teszteltük le. Azért választottuk ezt a két törzset, mert így mindkét kiindulási genotípust be tudtuk vonni a kísérletbe – a 243-as GK Tavasz eredetű, a 249-es CY-45 eredetű. Megállapítottuk, hogy a vírust mechanikailag hatékonyan át lehet vinni mindkét vad típusú búzára és azok fogékonyak a kórokozó általunk használt izolátumára. Üvegházban beállított kísérletünkben a két vad típusú kontroll, illetve a 243-1, 243-3, 243-4, 249-3, 249-4 és 249-8 számú törzsek 16-16 egyedét inokuláltuk BSMV-vel, 4-4 növény pedig mock inokulált kontrollként szolgált. A vetéstől számított 15-18. hétre kialakultak a tünetek. A vad típusú növényeken közepesnél erősebb kórképek jelentkeztek, míg a TDH növények 85 %-a tünetmentes volt, fennmaradó részükön is legfeljebb csak közepes erősségű kórképeket regisztráltunk. Megmértük a levelek SPAD-értékét is, amely a klorofilltartalomról, ezáltal a fotoszintézis intenzitásáról nyújtott objektív információt. Sikeresen alkalmazták ezt a módszert például búza genotípusok szárazságstressz-tűrésének jellemzésére (Li és mtsai, 2011), de a vírusfertőzések fotoszintézisre gyakorolt hatását még nem vizsgálták vele. A SPAD értékek változása teljes összhangban volt a szubjektíven regisztrált tüneti pontok alakulásával. Statisztikailag értékelve az adatokat megállapítottuk, hogy a BSMV hatására a két vad típusú búza fotoszintetikus aktivitása saját mock inokulált kontrolljukhoz viszonyítva szignifikánsan lecsökkent, míg a TDH törzseknél

tapasztalt változás nem volt szignifikáns. McMullen és mtsai (1978), valamint Goodman és mtsai (1991) részletesebb leírást közöltek a BSMV által okozott kloroplasztisz elfajulásokról, amelyek a kísérletünkben szereplő TDH növényekben feltehetően egyáltalán nem, vagy csak korlátozottan jelentkeztek. Tehát az indukált RNS-interferencia miatt gátolt lehetett a vírus szaporodása a növényi sejtekben. Ezen feltevésünket DAS-ELISA teszttel bizonyítottuk. Minden megvizsgált GK Tavasz és CY-45 levélben a fertőzöttségi limitet erősen meghaladó adatokat kaptunk, míg a TDH növényekben határérték alatti, vagy azt alig meghaladó víruskoncentrációt mértünk. A tünetek felvételezése, a klorofilltartalom mérése és a szerológiai tesztek során kapott eredmények tehát alátámasztották egymást, szembetűnő ellentmondásokat nem tapasztaltunk. Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy a beépített fordítva ismétlődő DNS-szekvenciák indukálták az RNS-interferenciát, ezért a BSMV szaporodása gátolt volt a kísérleti növényekben. Betakarításkor megvizsgáltuk a növénymagasság, a kalászhossz, az ezerszemtömeg és a termés alakulását. A mock inokulált vad típusú törzsek és a TDH növények közötti különbség nem volt szignifikáns, tehát a G-plazmid beépítése nem volt hatással a vizsgált terméskialakító komponensekre. Másrészt igazoltuk, hogy a vírussal inokulált TDH törzsek és vad típusú búzák eredményei közötti eltérések szignifikánsak voltak, tehát a fordítva ismétlődő szekvenciákat expresszáló növények valóban ellenállóbbnak bizonyultak a BSMV-vel szemben, mint a szekvenciákat nem tartalmazó kontrollok. A mock inokulált és a vírussal inokulált növények között az egyes genotípusokon belül észlelt különbségek a CY-45-nél és a GK Tavasznál várakozásainknak megfelelően szignifikánsak voltak, míg a TDH törzseknél nem – kivéve a kalászhossz csökkenését a 249-4 és a 249-8 jelű növényeknél. Egyes genotípusok adatai nagy szórást mutattak (aláhúzott számok a 24. táblázatban). Véleményünk szerint ez nem genetikai kiegyenlítetlenségből eredt, hanem epigenetikai hatás, vagy a vírus által generált interferenciagátlás következménye volt, amely növényenként más-más szinten jelentkezett. A növényvírusok ez utóbbi képessége intenzíven tanulmányozott és széles körben publikált (Bragg és Jackson, 2004)

Számos kétszikű növényben vitték már sikerre az RNS-interferenciát vírusrezisztencia kialakítása céljából, például dohányban, paradicsomban, szőlőben, szójababban, babban és gyapotban. Amerikai, ugandai és kenyai kutatóintézetek együttműködésével indult útjára 2005-ben az ún. VIRCA (Virus Resistant Cassava for Africa) projekt, amelynek célja a manióka legjelentősebb vírusaival szemben rezisztens fajták előállítására RNS-interferencia segítségével. A munka során 26 vektorkonstrukciót építettek, 1250 független transzformáns állítottak elő és 12.000 növényt teszteltek üvegházban, jelenleg pedig a szántóföldi kipróbálás folyik (Taylor és mtsai, 2012). Egyszikűekben jóval kevesebb eredményt publikáltak eddig. Rizzsel kapcsolatos a legtöbb közlemény (Jiang és mtsai, 2013; Sasaya és mtsai, 2014), mert a rizs transzformációs protokollja mára rutinszerűvé vált. Zhang és mtsai (2013) a DNS-genomú geminivírusok közül a Maize dwarf *mastrevirussal* szemben ellenálló kukorica vonalakat hoztak létre és tesztelték azokat szántóföldi körülmények között.

A disszertáció tárgyát képező kórokozók közül tudomásunk szerint csak a BYDV-vel és a WSMV-vel kapcsolatban írtak le eddig RNS-interferencián alapuló rezisztenciát. Wang és mtsai (2000) a legelsőik között – néhány évvel a jelenség felfedezése után – közölték, hogy sikerült előállítaniuk 25 árpatorzset, amelyek fordítva ismétlődő BYDV-eredetű szekvenciákat hordoztak. Közülük kilenc immunissá vált a kórokozóval szemben, mert sem szerológiailag, sem vektorátvitellel nem tudták kimutatni bennük a vírust. Bizonyították a rendszer szekvenciaspecifikusságát is, mert az immunis törzsek CYDV-vel szemben fogékonyak maradtak. Búzában még csak WSMV-vel szembeni rezisztenciáról tudunk, amelyet Philip Larkin ausztrál kutatócsoportja publikált. A kórokozó NIa enzimének génjére specifikus szekvenciákat építettek be a gazdanövénybe, és a T₁ generáció 16 törzsből 10 teljes rezisztenciát mutatott: nem észleltek tüneteket, szerológiailag és RT-PCR-rel sem tudták kimutatni a vírust, és az inokulált növények szövethnedvével nem lehetett átvinni a betegséget másik növényre (Fahim és mtsai, 2010). Az intronnal elválasztott fordítva ismétlődő szekvenciákat tartalmazó vektorkonstrukciók lehetővé teszik több vírussal szembeni rezisztencia kialakítását is ugyanabban a növényben, azonban ilyen eredményből eddig meglehetősen kevés született. Bucher és mtsai (2006) elsőként hoztak létre egyszerre 4 vírussal szemben ellenálló dohányt. Zhang és mtsai (2011) Alfalfa mosaic *alfamovirus*, Bean pod mottle *comovirus*, és Soybean mosaic *potyvirus* fertőzésekre rezisztens szójakat állítottak elő, amelyekben szimultán inokuláció esetén is gátolt volt a vírusok replikációja. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy kísérletünkben a G-plazmiddal búzába juttatott fordítva ismétlődő szekvenciák feltehetően nemcsak a BSMV, hanem a másik három vírus ellen is rezisztensek lehetnek.

Kísérletünk elérte célját: kétféle búza genetikai háttérben is sikerült indukálnunk az RNS-interferencia elvén működő vírusrezisztenciát, amely BSMV-vel szemben hatékonynak bizonyult, mivel a növények fotoszintetikus aktivitása és termése sem változott szignifikánsan a vírussal történt inokuláció hatására. Az alkalmazott vektorkonstrukció révén a növények elveikben BYDV-, WDV- és WSMV-fertőzéssel szemben is ellenállóak, de ez további bizonyítást kíván.

5.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdésünkre pozitív választ kaptunk, mivel a primerek alkalmasnak bizonyultak PCR-alapú vírusdiagnosztikai célokra. A szerológiai és a molekuláris módszerek eredményei jól korreláltak egymással. A PCR alátámasztotta az ELISA adatokat, ezzel meg tudtuk erősíteni a korábban búzában (Robertson és mtsai, 1991), árpában (Figueira és mtsai, 1997) és zabban (Mumford és mtsai, 2004) publikált hasonló eredményeket. A reakciók optimalizálásával a PCR-alapú módszer lehetővé tette három RNS-vírus szimultán vizsgálatát (Malmstrom és Shu, 2004). A PCR 22 esetben pozitív eredményt adott olyan mintáknál, amelyek negatívak voltak ELISA-val. Ez is mutatja, hogy a

molekuláris módszer érzékenyebb a szerológiaiainál. A pontos mennyiségi meghatározáshoz tehát inkább a qRT-PCR használatát javasoljuk ugyanezekkel a primerekkel. Négy esetben a pozitív ELISA minta negatív maradt PCR-rel. Manuális hiba is történhetett, de az is lehetséges, hogy olyan vírustörzs fertőzte meg a növényt, amelynek bázissorendje nem volt komplementer a primerekkel.

A vizsgált szezonban a kísérleti tenyészertben a BYDV volt a domináns vírus a mintavétel idején. Feltehetően kedvezett a különösen enyhe őszi időjárás a levéltetű fajok megtelepedésének, amelyek késő októberig táplálkoztak az őszi búzán. Kabócákat és atkákat viszont ősszel és tavasszal is nagyon kevés számban figyeltünk meg, ezzel összhangban a WDV és WSMV kártétele sokkal kevésbé volt jellemző. A mechanikailag terjedő BSMV mindkét módszerrel csak egy mintából volt kimutatható. Eredményeink ráirányítják a figyelmet a vetésidő fontosságára! A BYDV szignifikánsan több mintában volt jelen a korai vetésű populációban, mint a későbbi vetésűben. A korai vetésidő tehát kockázatos, mert könnyebben alakulhatnak ki a fertőzések, szélsőséges esetben járvány (Perry és mtsai, 2000). Tavasszal már látszott ezen növények fejletlensége, ami – bár nem képezte vizsgálataink tárgyát – minden bizonnyal termésvesztéshez vezetett. A kísérletben részt vett búza genotípusok fogékonyságbeli különbségét ilyen kevés számú minta alapján nem lehet hitelt érdemlően jellemezni. Tanulmányunknak ez nem is volt célja, csak a módszertani összehasonlításra koncentráltunk.

5.4. Új tudományos eredmények

1. Megállapítottuk, hogy a „T-124” búzatörzs csíranövény fenofázisban 5000 mg·l⁻¹-es koncentrációjú glufozinát-ammónium kezelést is túlél, valamint hogy az extrém magas dózisban alkalmazott glufozinát-ammónium a detoxifikáló *bar* gén expressziója ellenére is gátolja az apikális dominanciát, ezáltal erőteljes bokrosodást indukál és fejletlen, esetenként steril kalászokat eredményez.
2. Megállapítottuk, hogy a glufozinát-ammónium CY-45 búza genotípusra vonatkoztatott letális dózisához képest 64-szer magasabb koncentráció hatására sem változik szignifikánsan a *bar* gént konstitutívan expresszáló „T-124” búzatörzs termésmennyisége.
3. Kétféle donor búza genotípust felhasználva előállítottunk 38 fertilis növényt, amelyek az RNS-interferenciát indukáló fordítva ismétlődő DNS-szekvenciákat expresszálnak, ezáltal rezisztensek lehetnek az árpa csíkos mozaik, az árpa sárga törpülés, a búza törpülés és a búza csíkos mozaik betegségekre. Közülük 13 olyan konstrukciót tartalmaz, amely mind a négy betegséggel szemben védelmet nyújthat.
4. Szelektív portoktenyésztést alkalmazva 22 transzformáns dihaploid búzatörzset hoztunk létre, amelyek utódnemzedékei genetikailag nem hasadnak a fordítva ismétlődő virális DNS-szekvenciákra nézve.
5. Üvegházi körülmények között hat dihaploid búzatörzs növényeit mesterségesen inokuláltuk árpa csíkos mozaik vírussal. Statisztikailag igazoltuk, hogy a kórokozónak nem volt szignifikáns hatása a növények fotoszintetikus aktivitására, a növénymagasságra, az ezerszemtömegre és a termésmennyiségre sem. Szerológiaiilag bizonyítottuk, hogy a dihaploid növényekben gátolt volt a vírus replikációja, tehát sikeresen indukáltuk az RNS-interferenciát kétféle búza genetikai háttérben.
6. Bizonyítottuk, hogy a (BSMV Bb 156 for + BSMV Bb 1178 rev), a (PAV Sal2 S for + PAV Sal2 S rev), a (WDV S for + WDV S rev) és a (WSMV 1000 for + WSMV 1565 rev) primerpárok alkalmasak szántóföldi vírusfertőzések detektálására PCR-alapú technikák alkalmazásakor.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A búza terméshozamát sokféle abiotikus és biotikus stresszfactor csökkentheti. Értekezésem első részében egy széles spektrumú herbicid, a glufozinát-ammónium hatását vizsgáltam egy olyan búzatörzsből, amely a detoxifikáló *bar* gént expresszálja. A búza csírázás idején legérzékenyebb erre a hatóanyagra, ezért érett embriókat csíráztattunk a hatóanyag 14-féle dózisával kiegészített táptalajokon. Az *in vitro* szakasz során kapott növénykéket üvegházba ültettük ki és magfogásig neveltük azokat. Betakarításkor feljegyeztük a kalászszaámot, a kaláskonkénti szemszaámot, az ezerszemtömeget és a termést. Előkísérletünkben a glufozinát-ammónium letális dózisa $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ alatt volt a *bar* gént nem hordozó búza esetében. Ehhez képest a gént expresszáló genotípus embriói $5000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ hatóanyag-koncentrációjú táptalajon is kicsíráztak és fertilis kalászokat neveltek. Az extrém magas dózisú glufozinát-ammónium erőteljes bokrosodást okozott, valamint szignifikánsan csökkentette a kaláskonkénti szemszaámot és az ezerszemtömeget. A növények termése $64 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ herbicid hatására még nem változott statisztikailag, vagyis kísérletünkben a *bar* gén legalább 64-szeres rezisztenciát biztosított a vad típusú kontrollhoz képest.

Dolgozatom második részében a búza vírusokkal szembeni rezisztenciáját tanulmányoztam. Hazánkban az árpa csíkos mozaik, az árpa sárga törpülés, a búza törpülés és a búza csíkos mozaik vírusok károsítják leggyakrabban a búzavetések. Valamennyi súlyos termés kiesést okozhat, sőt együttesen is megbetegíthetik a növényeket. Munkánk során az RNS-interferencia indukálásával próbáltunk meg kialakítani vírusrezisztenciát két modell búzatörzsből. Hétféle vektorkonstrukciót használtunk, amelyek a kórokozók legkonzervatívabb nukleinsav-régióinak megfelelő, intronnal elválasztott fordítva ismétlődő DNS-szekvenciákat tartalmaztak. Összesen 38 fertilis pozitív T_0 növényt kaptunk, amelyek utódgenerációiból szelektív portoktenyésztéssel dihaploid törzseket állítottunk elő. Hat TDH törzs és a két vad típusú búza egyedét zárt rendszerű üvegházban mesterségesen inokuláltuk árpa csíkos mozaik vírussal, és megvizsgáltuk a kórokozó hatását a fotoszintetikus aktivitásra és a terméskialakító komponensekre. A mock inokulált kontrollokhoz képest a vírussal inokulált vad típusú búzában szignifikánsan csökkent a fotoszintézis, valamint a növénymagasság, a kalász hossz, a termés és az ezerszemtömeg is. A dihaploid törzseknél ezt nem tapasztaltuk. Néhány növény víruskoncentrációját DAS-ELISA módszerrel is ellenőriztük és a fentieket megerősítő eredményt kaptunk. Mindkét modell búza genotípusban sikerült rezisztenciát kialakítanunk az RNS-interferencia segítségével. A vektorkonstrukció jellegéből adódóan az előállított növények elvileg ellenállóak árpa sárga törpüléssel, búza törpüléssel és búza csíkos mozaikkal szemben is, de ez még bizonyítást kíván. A munka során készült primerek közül nyolcat fel tudtunk használni szántóföldi vírusfertőzések polimeráz láncreakcióval való kimutatására is. Összehasonlítva ennek érzékenységét és hatékonyságát a DAS-ELISA teszttel megállapítottuk, hogy biztonságos és gyors detektálást tesz lehetővé.

7. SUMMARY

Wheat is exposed to many abiotic and biotic stresses causing yield depression. In the first part of my study, the impact of glufosinate ammonium, a wild range herbicide was analysed on a wheat line constitutively expressing the detoxifying *bar* gene. Wheat is the most sensitive against this herbicide during seed germination. Because of this, mature embryos were excised from donor seeds and put onto selective media containing 14 different concentrations of glufosinate ammonium for germination. After the *in vitro* period, plantlets were transferred to soil in greenhouse, grown to maturity and harvested. We recorded and analysed the number of spikes per plant, grains per spikes, thousand kernel weight and yield. In a preliminary experiment, lethal dose of glufosinate ammonium was less than $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in *bar*⁻ wheat. Interestingly, *bar*⁺ plants treated with $5000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ herbicide could germinate and produced fertile spikes. Extremely high concentrations of glufosinate ammonium caused a bushy phenotype, significantly lower numbers of grains per spike and thousand kernel weights. Concerning the productivity, we observed that concentrations of glufosinate ammonium 64 times the lethal dose did not lead to yield depression.

In the second part of the thesis, I studied the resistance of wheat against viral pathogenes. Four viruses occur frequently on cereals in Hungary: barley stripe mosaic, barley yellow dwarf, wheat dwarf and wheat streak mosaic. Each can cause severe yield depression and they can infect the plants together, too. We tried to create resistance in two model wheat varieties with the induction of RNA interference. Seven plasmids were constructed containing intron separated inverted repeat sequences complementary to the most conservative regions of the four pathogens. Totally 38 fertile positive T₀ plants were harvested and their progenies were used as donors for selective anther culture in order to have homozygous populations. Six doubled haploid strains and the two wild type control varieties were artificially inoculated with barley stripe mosaic virus in greenhouse and photosynthetic activity were recorded as well as yield parameters. In the wild type varieties inoculated with the virus significant losses were found in photosynthesis, plant height, length of spikes, thousand kernel weight and yield compared to the mock inoculated controls. Similar decreasing was not observed in the doubled haploid plants. Virus titer of some plants was checked by DAS-ELISA method and data confirmed the above mentioned results. We managed to create resistance in two different wheat genetic backgrounds with the aid of RNA interference. According to the plasmid construction, the plants can be resistant not only to barley stripe mosaic but also barley yellow dwarf, wheat dwarf and wheat streak mosaic. This fact must be confirmed by further examinations.

Polymerase chain reactions were done with a set of primer pairs in our experiments and four of them proved to be useful for detection of natural virus infections. We compared the sensitivity and efficiency with DAS-ELISA method and found that the four primer pairs make possible accurate and fast virus detection.

MELLÉKLETEK

M1: Irodalomjegyzék

- Ahlandsberg S., Sathish P., Sun C., Jansson S. (2001): A set of useful monocotyledon transformation vectors. *Biotechnology Letters*, 23 (22): 1871-1875
- Al-Ani R. A., Adhab M. A., El-Muadhidi M. A., Al-Fahad M. A. (2012): Biological and serological identification of barley yellow dwarf virus (BYDV) and its distribution in Iraq. *Journal of Agricultural Science*, 4 (2): 39-48
- Almási A. (1999): Elektronmikroszkópos módszerek. In: Horváth J., Gáborjányi R. (1999): *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 168-179
- Altpeter F., Baisakh N., Beachy R., Bock R., Capell T., Christou P., Daniell H., Datta K., Datta S., Dix P. J., Fauquet C., Huang N., Kohli A., Mooibroek H., Nicholson L., Nguyen T. T., Nugent G., Raemakers K., Romano A., Somers D. A., Stoger E., Nigel T., Visser R. (2005): Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Molecular Breeding*, 15 (3): 305-327
- Aulinger I. E., Peter S. O., Schmid J. E., Stamp P. (2003): Rapid attainment of a doubled haploid line from transgenic maize (*Zea mays* L.) plants by means of anther culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 39 (2): 165-170
- Avila-Garcia W. V., Mallory-Smith C. (2011): Glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne*) populations also exhibit resistance to glufosinate. *Weed Science*, 59 (3): 305-309
- Avrameas S. (1969): Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6 (1): 43-52
- Ayala L. N., van Ginkel M., Khairallah M., Keller B., Henry M. (2001): Expression of *Thinopyrum* intermedium-derived Barley yellow dwarf virus resistance in elite bread wheat backgrounds. *Phytopathology*, 91 (1): 55-62
- Baisakh N., Datta K., Oliva N., Ona I., Rao G. J. N., Mew T. W., Datta S. K. (2001): Rapid development of homozygous transgenic rice using anther culture harboring rice chitinase gene for enhanced sheath blight resistance. *Plant Biotechnology*, 18 (2): 101-108
- Balla L. (2002): A kalászosgabona-termesztés helye és szerepe a hazai agrárgazdaságban. In: Balla L. (szerk.) *Kalászosgabona-termesztés, gazdálkodási stratégia*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 9-15
- Baltenberger D. E., Ohm H. W., Foster J. W. (1987): Reactions of oat, barley and wheat to infection with barley yellow dwarf isolates. *Crop Science*, 27 (2): 195-198
- Bapat V. A. (2013): Recent advances in ribonucleic acid interference (RNAi). *National Academy Science Letters - India*, 36 (1): 1-8

- Basky Zs. (2005): Levéltetvek. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 67-91
- Baulcombe D. (2004): RNA silencing in plants. *Nature*, 431 (7006): 356-363
- Baulcombe D. (2005): RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 30 (6): 290-293
- Bayer E., Gugel K. H., Hägele K., Hagenmaier H., Jassipow S., König W. A., Zähler H. (1972): Stoffwechselfprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricinyl-Alanyl-Alanin. *Helvetica Chimica Acta*, 55 (1): 224-239
- Baykal U., Zhang Z. (2010): Small RNA-mediated gene silencing for plant biotechnology. In: Catalano A. J. (szerk.): *Gene silencing: theory, techniques and application*. New York: Nova Science Publishers Inc., 255-269
- Bayley C., Trolinder N., Ray C., Morgan M., Quinsberry J. E., Ow D. W. (1992): Engineering 2,4-D resistance into cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 83 (5): 645-649
- Benkovics A. H., Vida Gy., Nelson D., Veisz O., Bedford I., Silhavy D., Boulton M. I. (2010): Partial resistance to Wheat dwarf virus in winter wheat cultivars. *Plant Pathology*, 59 (6): 1144-1151
- Berzsenyi Z. (2011a): A gyomszabályozás módszerei. In: Hunyadi K., Béres I., Kazinczi G. (szerk.): *Gyomnövények, gyombiológia, gyomirtás*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 337-395
- Berzsenyi Z. (2011b): Herbicidrezisztens gyomnövények és herbicidtoleráns kultúrnövények. In: Hunyadi K., Béres I., Kazinczi G. (szerk.): *Gyomnövények, gyombiológia, gyomirtás*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 465-496
- Bhalla P. L., Ottenhof H. H., Singh M. B. (2006): Wheat transformation – an update of recent progress. *Euphytica*, 149 (3): 353-366
- Blackman R. L., Eastop V. F. (1989): Aphids on the world's crops: an identification guide. New York (NY, USA): John Wiley & Sons, 466
- Boulton M. I. (2002): Functions and interactions of mastrevirus gene products. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60 (5): 243-255
- Bragg J. N., Jackson A. O. (2004): The C-terminal region of the Barley stripe mosaic virus γ b protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. *Molecular Plant Pathology*, 5 (5): 465-481
- Brakke M. K. (1971): Wheat streak mosaic virus. *CMI/AAB. Descriptions of plant viruses*, No. 48
- Brodersen P., Voinnet O. (2006): The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22 (5): 268-280
- Brown C. M., Dinesh-Kumar S. P., Miller W. A. (1996): Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *Journal of Virology*, 70 (9): 5884-5892
- Brown, J. K., Fauquet C. M., Bridson R. W., Zerbini M., Moriones E., Navas-Castillo J. (2012): Geminiviridae. In: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (szerk.): *Virus Taxonomy – Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, Waltham (MA, USA), San Diego (CA, USA): Elsevier, 351-373

- Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L. (szerk.) (1996): Viruses of plants – descriptions and lists from the VIDE database. Wallingford, UK: CAB International, 67-1420
- Bucher E., Lohuis D., van Poppel P. M. J. A., Geerts-Dimitriadou C., Goldbach R., Prins M. (2006): Multiple virus resistance at high frequency using a single transgene construct. *Journal of General Virology*, 87 (12): 3697-3701
- Burnett P. A., Mezzalama M. (1990): The barley yellow dwarf screening program of CIMMYT. In: Burnett P. A. (szerk.): *World perspectives of barley yellow dwarf*. Mexikóváros: CIMMYT, 434-440
- Byamukama E., Tatineni S., Hein G. L., Graybosch R. A., Baenziger P. S., French R., Wegulo S. N. (2012): Effects of single and double infections of winter wheat by Triticum mosaic virus and Wheat streak mosaic virus on yield determinants. *Plant Disease*, 96 (6): 859-864
- Campbell J., Huang L. (2010): Silencing of multiple genes in wheat using Barley stripe mosaic virus. *Journal of Biotech Research*, (2): 12-20
- Carrington J. C., Dougherty W. G. (1987): Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology*, 61 (8): 2540-2548
- Carrington J. C., Jensen P. E., Schaad M. C. (1998): Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal*, 14 (4): 393-400
- Carrol T. W. (1980): Barley stripe mosaic virus: Its economic importance and control in Montana. *Plant Disease*, 64 (2): 136-140
- Chen Q., Conner R. L., Ahmad F., Laroche A., Fedak G., Thomas J. B. (1998): Molecular characterization of the genome composition of partial amphiploids derived from *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum* and *T. aestivum* × *Th. intermedium* as sources of resistance to Wheat streak mosaic virus and its vector, *Aceria tosichella*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (1-2): 1-8
- Choi I. R., Stenger D. C., French R. (2000): Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritimovirus. *Virology*, 267 (2): 185-198
- Choi K. W., Han O., Lee H. J., Yun Y. C., Moon Y. H., Kim M., Kuk Y. I., Han S. U., Guh J. O. (1998): Generation of resistance to the diphenyl ether herbicide, oxyfluorfen, via expression of the *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene in transgenic tobacco plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62 (3): 558-560
- Christensen A. H., Quail P. H. (1996): Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5 (3): 213-218
- Christian M. L., Willis W. G. (1993): Survival of wheat streak mosaic virus in grass hosts in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. *Plant Disease*, 77 (3): 239-242

- Clark M. F., Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34 (March): 475-483
- Comeau A. (1982): Geographic distribution of resistance to barley yellow dwarf virus in *Avena sterilis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4 (2): 147-151
- Commandeur U., Huth W. (1999): Differentiation of strains of wheat dwarf virus in infected wheat and barley plants by means of polymerase chain reaction. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 106 (5): 550-552
- Creager A. N. H., Scholthof K. B. G., Citovsky V., Scholthof H. B. (1999): Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century. *The Plant Cell*, 11 (3): 301-308
- Culpepper A. S., York A. C. (1997): Weed management in no-tillage bromoxynil-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum*). *Weed Technology*, 11 (2): 335-345
- Dahmer M., Carlson D., Fellows G., Taylor F., Fabrizius C., Shelton C., Schmidt D. (2002): Clearfield™ wheat production system – Beyond™ herbicide (imazamox) for use with Clearfield™ wheat. *Weed Science Society of America Abstracts*, 42: 64
- D'Arcy C. J. (1995): Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. In: D'Arcy C. J., Burnett P. A. (szerk.): *Barley yellow dwarf – 40 years of progress*. St. Paul (MN, USA): The American Phytopathological Society Press, 9-28
- D'Arcy C. J., Domier L. L., Mayo M. A. (2000): Luteoviridae. In: van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L., Carstens E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R., Wickner R. B. (szerk.): *Virus taxonomy – Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego (CA, USA): Academic Press, 775-778
- Dear B. S., Sandral G. A., Spencer D. (2003): The tolerance of three transgenic subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) lines with the bxn gene to herbicides containing bromoxynil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54 (2): 203-210
- Deb M., Anderson J. M. (2008): Development of a multiplexed PCR detection method for barley and cereal yellow dwarf viruses, wheat spindle streak virus, wheat streak mosaic virus and soil-borne wheat mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 148 (1-2): 17-24
- del Rosario M. S. E., Sill W. H. Jr. (1965): Physiological strains of *Aceria tulipae* and their relationship to the transmission of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology*, 55: 1168-1175
- Dill G. M. (2005): Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*, 61 (3): 219-224
- Dinesh-Kumar S. P., Brault V., Miller W. A. (1992): Precise mapping and in vitro translation of a trifunctional subgenomic RNA of barley yellow dwarf virus. *Virology*, 187 (2): 711-722
- Ding S. W., Li H., Lu R., Li F., Li W. X. (2004): RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research*, 102 (1): 109-115

- Ding S. W., Voinnet O. (2007): Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130 (3): 413-426
- Domier L. L. (2012): Family Luteoviridae. In: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (szerk.): *Virus Taxonomy – Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, Waltham (MA, USA), San Diego (CA, USA): Elsevier, 1045-1053
- Dong J., He Z., Han C., Chen X., Zhang L., Liu W., Han Y., Wang J., Zhai Y., Yu J., Liu Y., Xiao Y. (2002): Generation of transgenic wheat resistant to Wheat yellow mosaic virus and identification of gene silencing induced by virus infection. *Chinese Science Bulletin*, 47 (17): 1446-1450
- Dougherty W. G., Semler B. L. (1993): Expression of virus-encoded proteinase: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, 57 (4): 781-822
- Dudits D. (2006): A búzakeresztes, mint mérföldkő a hazai búzakeresztesben. In: Dudits D. (szerk.): *A búza nemesítésének tudománya – a funkcionális genomikától a vetőmagig*. Szeged: MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair Kft., 12-15
- Dudits D., Heszky L. (szerk.) (2000): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Budapest: Agroinform Kiadó, 234-240
- Duke S. O. (2005): Taking stock of HT crops ten years after introduction. *Pest Management Science*, 61 (3): 211-218
- Duke S. O., Powles, S. B. (2008): Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64 (4): 319-325
- Dwyer G. I., Gibbs M. J., Gibbs A. J., Jones R. A. C. (2007): Wheat streak mosaic virus in Australia: relationship to isolates from the Pacific Northwest of the USA and its dispersion via seed transmission. *Plant Disease*, 91 (2): 164-170
- Eberlein C. V., Guttieri M. J., Steffen-Campbell J. (1998): Bromoxynil resistance in transgenic potato clones expressing the bxn gene. *Weed Science*, 46 (2): 150-157
- Edwards M. C., McMullen M. P. (1988): Variation in tolerance to wheat streak mosaic virus among cultivars of hard red spring wheat. *Plant Disease*, 72 (8): 705-707
- Ellis M. H., Rebetzke G. J., Kelman W. M., Moore C. S., Hyles J. E. (2004): Detection of wheat streak mosaic virus in four pasture grass species in Australia. *Plant Pathology*, 53 (2): 239
- Evans L. T., Fischer R. A. (1999): Yield potential: its definition, measurement and significance. *Crop Science*, 39 (6): 1544-1551
- Érsek T., Gáborjányi R. (1998): Növénykórokozó mikroorganizmusok. Budapest: ELTE Eötvös Kiadó, 61-92
- Fahim M., Ayala L. N., Millar A. A., Larkin P. J. (2010): Hairpin RNA derived from viral NIa gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (7): 821-834

- Fauquet C. M., Briddon R. W., Brown J. K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X. (2008): Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, 153 (4): 783-821
- Felföldi K., Purnhauser L. (1992): Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cereal Research Communications*, 20 (3-4): 273-277
- Fernandez A., Ghuo H. S., Saenz P., Simon-Buela L., Gomez de Cedron M., Garcia J. A. (1997): The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acid Research*, 25 (22) 4474-4480
- Fernandez A., Lain S., Garcia J. A. (1995): RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acid Research*, 23 (8) 1327-1332
- Figueira A. R., Domier L. L., D'Arcy C. J. (1997): Comparison of techniques for detection of barley yellow dwarf virus PAV-IL. *Plant Disease*, 81 (11): 1236-1240
- Filipowicz W. L., Jaskiewicz L., Kolb F. A., Pillai R. S. (2005): Posttranscriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Current Opinion in Structural Biology*, 15 (3): 331-341
- Fire A., Xu S. Q., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 (6669): 806-811
- Friebe B., Gill K. S., Tuleen N. A., Gill B. S. (1996): Transfer of wheat streak mosaic virus resistance from *Agropyrum intermedium* into wheat. *Crop Science*, 36 (4): 857-861
- Fuchs M., Gonsalves D. (2002): Genetic engineering and resistance to viruses. In: Khachatourians G. G., McHughen A., Scorza R., Nip W. K., Hui Y. H. (szerk): *Transgenic plants and crops*. New York, Basel: Marcel Dekker Inc., 217-231
- Fusaro A. F., Matthew L., Smith N. A., Curtin S. J., Dedic-Hagan J., Ellacott G. A., Watson J. M., Wang M. B., Brosnan C., Carroll B. J., Waterhouse P. M. (2006): RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Reports*, 7 (11): 1168-1175
- Gafni Y., Epel B. L. (2002): The role of host and viral proteins in intra- and intercellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60 (5): 231-241
- Gáborjányi R., Bisztrai Gy., Vacke J. (1988): Búza törpülés vírus: új gabonapatogén Magyarországon. *Növénytermelés*, 37: 495-500
- Gáborjányi R., Nagy P. D. (1988): Wheat streak mosaic virus in Hungary. *Növénytermelés*, 37: 391-395
- Ghildiyal M., Zamore P. D. (2009): Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10 (2): 94-108
- Gill C. C., Chong J. (1979): Cytopathological evidence for the division of barley yellow dwarf virus isolates into two subgroups. *Virology*, 95 (1): 59-69

- Glits M., Folk Gy. (1993): Kertészeti növénykórtan. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 35-49
- Goodman R. N., Király Z., Wood K. R. (1991): A beteg növény biokémiája és élettana. Budapest: Akadémiai Kiadó, 104 p. és 643-683
- Gopalakrishnan S., Garg G. K., Singh D. T., Singh N. K. (2000): Herbicide-tolerant transgenic plants in high yielding commercial wheat cultivars obtained by microprojectile bombardment and selection on Basta. *Current Science*, 79 (8): 1094-1100
- Green J. M. (2007): Review of glyphosate and ALS-inhibiting herbicide crop resistance and resistant weed management. *Weed Technology*, 21 (2): 547-558
- Green J. M., Owen M. D. K. (2011): Herbicide-resistant crops: utilities and limitations for herbicide-resistant weed management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (11): 5819-5829
- Gustafson G., Armour S. L. (1986): Complete nucleotide sequence of RNA β of the type strain of barley stripe mosaic virus. *Nucleic Acids Research*, 14 (9) 3895-3909
- Gutierrez C. (1999): Geminivirus DNA replication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56 (3-4): 313-329
- Haasnoot J., Westerhout E. M., Berkhout B. (2007): RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nature Biotechnology*, 25 (12): 1435-1443
- Habili N., McInnes J. L., Symons R. H. (1987): Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for the routine diagnosis of barley yellow dwarf virus. *Journal of Virological Methods*, 16 (3): 225-237
- Habili N., Symons R. (1989): Evolutionary relationships between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in the putative RNA-polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acid Research*, 17 (23): 9543-9555
- Halbert S. E., Connelly J., Lister R. M., Klein R. E., Bishop G. W. (1992): Vector specificity of barley yellow dwarf virus serotypes and variants in south-western Idaho. *Annals of Applied Biology*, 121 (1): 123-132
- Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D. (2002): Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, 21 (17): 4671-4679
- Harrison B. D., Nixon H. L., Woods R. D. (1965): Length and structure of particles of barley stripe mosaic virus. *Virology*, 26 (2): 284-289
- Hayakawa T., Zhu Y., Itoh K., Kimura Y., Izawa T., Shimamoto K., Toriyama S. (1992): Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89 (20): 9865-9869
- Hebert-Soule D., Kikkert J. R., Reisch B. I. (1995): Phosphinothricin stimulates somatic embryogenesis in grape (*Vitis* sp. L.). *Plant Cell Reports*, 14 (6) 380-384
- Heszky L. (2005): Első generációs transzgénikus növények. In: Heszky L., Fésűs L., Hornok L. (szerk.): *Mezőgazdasági Biotechnológia*. Budapest: Agroiinform Kiadó, 163-170

- Hill J. H., Martinson C. A., Russell W. A. (1974): Seed transmission of maize dwarf mosaic and wheat streak mosaic viruses in maize and response of inbred lines. *Crop Science*, 14 (2): 232-235
- Holzberg S., Brosio P., Gross C., Pogue G. P. (2002): Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, 30 (3): 315-327
- Horváth G. V., Pettkó-Szandtner A., Nikovics K., Bilgin M., Boulton M., Davies J. W., Gutierrez C., Dudits D. (1998): Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. *Plant Molecular Biology*, 38 (5): 699-712
- Horváth J. (1972): Növényvírusok, vektorok, vírusátvitel. Budapest: Akadémiai Kiadó, 246-254 p. és 299-309
- Horváth J. (1995): A szántóföldi növények betegségei. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 16-18 p. és 44-47
- Horváth J. (1999a): A vírusok osztályozása és rendszertana. In: Horváth J., Gáborjányi R. (szerk.): *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 22-67
- Horváth J. (1999b): Növényvirológia. Keszthely: Pannon Agrártudományi Egyetem Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, 133-166
- Hoshino Y., Mii M. (1998): Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 17 (4): 256-261
- Hunger R. M., Sherwood J. L., Evans C. K., Montana J. R. (1992): Effects of planting date and inoculation date on severity of wheat streak mosaic in hard red winter wheat cultivars. *Plant Disease*, 76 (10): 1056-1060
- Hunyadi K., Béres I., Kazinczi G. (2011): A herbicidek hatása, metabolizmusa és a szelektivitás. In: Hunyadi K., Béres I., Kazinczi G. (szerk.): *Gyomnövények, gyombiológia, gyomirtás*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 399-414
- Irwin M. E., Thresh J. M. (1990): Epidemiology of barley yellow dwarf: a study in ecological complexity. *Annual Review of Phytopathology*, 28: 393-424
- Jablonowski J. (1895): A csíkos kabóca. *Köztelek*, 5 (2): 964
- Jackson A. O., Lim H. S., Bragg J., Ganesan U., Lee M. Y. (2009): Hordeivirus replication, movement and pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 385-422
- Jalaludin A., Ngim J., Bakar B. H. J., Alias Z. (2010): Preliminary findings of potentially resistant goosegrass (*Eleusine indica*) to glufosinate-ammonium in Malaysia. *Weed Biology and Management*, 10 (4): 256-260
- James C. (2013): Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. ISAAA Brief No. 46. Ithaca, New York: The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
- Janakiraman V., Steinau M., McCoy S. B., Trick H. N. (2002): Recent advances in wheat transformation. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 38 (5): 404-414

- Jarosova J., Chrpova J., Sip V., Kundu J. K. (2013): A comparative study of the Barley yellow dwarf virus species PAV and PAS: distribution, accumulation and host resistance. *Plant Pathol.*, 62 (2): 436-443
- Jarosova J., Kundu J. K. (2010): Validation of reference genes as internal control for studying viral infections in cereals by quantitative real-time RT-PCR. *BMC Plant Biology*, 10: Article 146
- Jensen S. G., Lane L. C., Seifers D. L. (1996): A new disease of maize and wheat in the high plains. *Plant Disease*, 80 (12): 1387-1390
- Jenser G., Mészáros Z., Sáringer Gy. (szerk.) (1998): A szántóföldi és kertészeti növények kártevői. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 86-96 p., 112-126 és 494-496
- Jezewska M., Trzmiel K. (2010): Impact of seed-transmitted viruses on quality of cereal seeds. *Journal of Plant Protection Research*, 49 (4): 460-464
- Jiang Y., Sun L., Jiang M., Li K., Song Y., Zhu C. (2013): Production of marker-free and RSV-resistant transgenic rice using a twin T-DNA system and RNAi. *Journal of Bioscience*, 38 (3): 573-581
- Jinek M., Doudna J. A. (2009): A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457 (7228): 405-412
- Jocic S., Malidza G., Cvejic S., Hladni N., Miklic V., Skoric D. (2011): Development of sunflower hybrids tolerant to tribenuron methyl. *Genetika*, 43 (1): 175-182
- Jolánkai M. (2005): Búza. In: Antall J. (szerk): *Növénytermesztés I. A növénytermesztés alapjai; Gabonafélék*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 183-204
- Jones R. A. C., Coutts B. A., Mackie A. E., Dwyer G. I. (2005): Seed transmission of wheat streak mosaic virus shown unequivocally in wheat. *Plant Disease*, 89 (10): 1048-1050
- Joshi R. L., Joshi V., Ow D. W. (1990): BSMV genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. *The EMBO Journal*, 9 (9): 2663-2669
- Kasschau K. D., Cronin S., Carrington J. C. (1997): Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper-component-proteinase. *Virology*, 228 (2): 251-262
- Kazinczi G. (1999): Szerológiai vizsgálati módszerek. In: Horváth J., Gáborjányi R. (1999): *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 242-268
- Kádár A. (2010): Vegyszeres gyomirtás és termés szabályozás. A szerző kiadása. 13 p., 85-86 és 126-135
- Kegler H., Spaar D. (1993): Types of and genes for resistance to plant pathogenic viruses. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 28 (2): 95-107
- Keller G., Spatola L., McCabe D., Martinell B., Swain W., John M. E. (1997): Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos. *Transgenic Research*, 6 (6): 385-392
- Király Z. (1987): A búza termesztése – kórokozók. In: Barabás Z. (szerk.): *A búzatermesztés kézikönyve*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 265-287

- Koev G., Mohan B. R., Dinesh-Kumar S. P., Torbert K. A., Somers D. A., Miller W. A. (1998): Extreme reduction of disease in oats transformed with the 5' half of the barley yellow dwarf virus-PAV genome. *Phytopathology*, 88 (10): 1013-1019
- Kosova K., Chrpova J., Síp V. (2008): Recent advances in breeding of cereals for resistance to barley yellow dwarf virus – a review. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 44 (1): 1-10
- Köklü G., Ramsell J. N. E., Kvarnheden A. (2007): The complete genome sequence for a Turkish isolate of Wheat dwarf virus (WDV) from barley confirms the presence of two distinct WDV strains. *Virus Genes*, 34 (3): 359-366
- Krueger E. N., Beckett R. J., Gray S. M., Miller W. A. (2013): The complete nucleotide sequence of the genome of Barley yellow dwarf virus-RMV reveals it to be a new Polerovirus distantly related to other yellow dwarf viruses. *Frontiers in Microbiology*, 4: Article 205
- Kukorelli G. (2012): Herbicid-toleráns kultúrnövények gyomszabályozása, és helyük Magyarország növénytermesztési szerkezetében. *Doktori értekezés*. Mosonmagyaróvár: Nyugat-Magyarországi Egyetem, Növénytudományi Doktori Iskola, 16-19
- Kundu J. K., Gadiou S., Cervena G. (2009): Discrimination and genetic diversity of Wheat dwarf virus in Czech Republic. *Virus Genes*, 38 (3): 468-474
- Kvarnheden A., Lindblad M., Lindsten K., Valkonen J. P. T. (2002): Genetic diversity of Wheat dwarf virus. *Archives of Virology*, 147 (1): 205-216
- Lane L. C., Skopp R. (1983): The coat protein of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology*, 73 (5): 791
- Langenberg W. G. (1991): Cylindrical inclusion bodies of wheat streak mosaic virus and three other potyviruses only self-assemble in mixed infections. *Journal of General Virology*, 72 (3): 493-497
- Lapierre, H., Signoret, P.A. (szerk.) (2004): Viruses and Virus Diseases of Poaceae (Graminae). Paris: INRA, 552-616
- Larkin P. J., Baeva K., Banks P. M., Lagudah E. S., Appels R., Chen X., Xin Z. Y., Ohm H. W., McIntosh R. A. (1995): Disomic *Thinopyrum* intermedium addition line sin wheat with barley yellow dwarf virus resistance and rust resistances. *Genome*, 38 (2): 385-394
- Larkin P. J., Brettel R. I. S., Banks P., Appels R., Waterhouse P. M., Cheng Z. M., Zhou G. H., Xin Z. Y., Chen X. (1990): Identification, characterization and utilization of sources of resistance to barley yellow dwarf virus. In: Burnett P. A. (szerk.): *World perspectives of barley yellow dwarf*. Mexikóváros: CIMMYT, 415-420
- Lea P. J., Joy K. W., Ramos J.L., Guerrero M. G. (1984): The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry*, 23 (1): 1-6
- Lee H. J., Lee S. B., Chung J. S., Han S. U., Guh J. O., Jeon J. S., An G., Back K. (2000): Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen

- oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. *Plant and Cell Physiology*, 41 (6): 743-749
- Li C., Jiang D., Wollenweber B., Li Y., Dai T., Cao W. (2011): Waterlogging pretreatment during vegetative growth improves tolerance to waterlogging after anthesis in wheat. *Plant Science*, 180 (5): 672-678
- Lindblad M., Sigvald R. (2004): Temporal spread of wheat dwarf virus and mature plant resistance in winter wheat. *Crop Protection*, 23 (3): 229-234
- Lindbo J. A., Dougherty W. G. (2005): Plant pathology and RNAi: a brief history. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 191-204
- Lindsten K., Vacke J. (1991): A possible barley adapted strain of Wheat dwarf virus (WDV). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 26: 175-180
- Lister R. M., Ranieri R. (1995): Distribution and economic importance of barley yellow dwarf. In: D'Arcy C. J., Burnett P. A. (szerk.): *Barley yellow dwarf – 40 years of progress*. St. Paul (MN, USA): The American Phytopathological Society Press, 29-53
- Lister R. M., Rochow W. F. (1979): Detection of barley yellow dwarf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*, 69 (6): 649-654
- Liu Y. W., Chou W. Y., Wang C. Y. (2005): In vitro induction of phosphinothricin tolerance in rice (*Oryza sativa*). *Plant Protection Bulletin (Taipei)*, 47 (1): 47-58
- Lomonosoff G. P. (1995): Pathogene-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 323-343
- Magyar G. (1987): A búza világelelmzésben betöltött szerepe. In: Barabás Z. (szerk.): *A búzatermesztés kézikönyve*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 18-29
- Malmstrom C. M., Shu R. (2004): Multiplexed RT-PCR for streamlined detection and separation of barley and cereal yellow dwarf viruses. *Journal of Virological Methods*, 120 (1): 69-78
- Mangwende T., Wang M. L., Borth W., Hu J., Moore P. H., Mirkov T. E., Albert H. H. (2009): The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology*, 384 (1): 38-50
- Manickavasagam M., Ganapathi A., Anbazhagan V. R., Sudhakar B., Selvaraj N., Vasudevan A., Kasthuriangan S. (2004): Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Reports*, 23 (3): 134-143
- Manurung B., Witsack W., Mechner S., Grüntzig M., Fuchs E. (2005): Studies on biology and population dynamics of the leafhopper *Psammotettix alienus* Dahlb. (Homoptera: Auchenorrhyncha) as vector of wheat dwarf virus (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112 (5): 497-507
- Markwell J., Osterman J. C., Mitchell J. L. (1995): Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*, 46 (3): 467-472
- Martin R. R., D'Arcy C. J. (1990): Relationships among luteoviruses based on nucleic acid hybridization and serological studies. *Intervirology*, 31 (1): 23-30

- Massiah A., Rong H. L., Brown S., Laurie S. (2001): Accelerated production and identification of fertile, homozygous transgenic wheat lines by anther culture. *Molecular Breeding*, 7 (2): 163-173
- McGrath P. F., Vincent J. R., Lei C. H., Pawlowski W. P., Torbert K. A., Gu W., Kaeppler H. F., Wan Y., Lemaux P. G., Rines H. R., Somers D. A., Larkins B. A., Lister R. M. (1997): Coat protein-mediated resistance to isolates of barley yellow dwarf in oats and barley. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (8): 695-710
- McKinney H. H. (1937): Mosaic disease of wheat and related cereals. *U. S. Department of Agriculture Circular*, 442: 23
- McKinney H.H., Fellows H., Johnston C.O. (1942): Mosaic of *Bromus inermis*. *Phytopathology*, 32: 331
- McKirby S. J., Jones R. A. C., Nutter F. W. (2002): Quantification of yield losses caused by barley yellow dwarf virus in wheat and oat. *Plant Disease*, 86 (7): 769-773
- McMullen C. R., Gardner W. S., Hyers G. A. (1978): Aberrant plastids in barley leaf tissue infected with barley stripe mosaic virus. *Phytopathology*, 68 (3): 317-325
- Mechner S., Manurung B., Grüntzig M., Habekuss A., Witsack W., Fuchs E. (2003): Investigations into the ecology of the Wheat dwarf virus (WDV) in Saxony-Anhalt, Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110 (4): 313-323
- Mergoum M., Froberg R. C., Rasmussen J. W., Friesen T. L., Hareland G., Simsek S. (2009): Breeding for Clearfield herbicide tolerance: registration of 'ND901CL' spring wheat. *Journal of Plant Registrations*, 3 (2): 170-174
- Mesterházy Á., Gáborjányi R., Papp M., Fónad P. (2002): Multiple virus infection on wheat in South Hungary. *Cereal Research Communications*, 30 (3-4): 329-334
- Metz P. L. J., Stiekema W. J., Nap J. P. (1998): A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. *Molecular Breeding*, 4 (4): 335-341
- Mérai Zs., Kerényi Z., Kertész S., Magna M., Lakatos L., Silhavy D. (2006): Double stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology*, 80 (12): 5747-5756
- Mihály R. (2009): Génvadászat, stabil genetikai transzformáció árpában és búzában. *Doktori értekezés. Gödöllő: Szent István Egyetem, Növénytermesztés-és kertészettudományi Doktori Iskola*, 34-35
- Mihály R., Kótai É., Kiss O., Pauk J. (2002): In vitro selection of transformed foreign gene (bar) in wheat anther culture. *Acta Biologica Szegediensis*, 46 (3-4): 9-10
- Milinkó I., Remete A. (1984): Fertőz a csíkos mozaik vírus. *Magyar Mezőgazdaság*, 39: 8
- Miller W. A., Liu S., Beckett R. (2002): Barley yellow dwarf virus: Luteoviridae or Tombusviridae? *Molecular Plant Pathology*, 3 (4): 177-183

- Miller W. A., Waterhouse P. M., Gerlach W. L. (1988): Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA. *Nucleic Acid Research*, 16 (13): 6097-6111
- Mullis K. B., Faloona F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350
- Mulwa R. M. S., Mwanza L. M. (2006): Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. *African Journal of Biotechnology*, 5 (5): 396-404
- Mumford R., Skelton A., Metcalfe E., Walsh K., Boonham N. (2004): The reliable detection of barley yellow and mild mosaic viruses using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods*, 117 (2): 153-159
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497
- Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (2013): A 2013. évi kalászosok és az őszi káposztarepce betakarítási adatai. *Agrofórum*, (9) 16-17
- Niks R. E., Habekus A., Bekele B., Ordon F. (2004): A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (7): 1536-1543
- Nyporko A. Y., Yemets A. I., Brytsun V. N., Lozinsky M. O., Blume Y. B. (2009): Structural and biological characterization of the tubulin interaction with dinitroanilines. *Cytology and Genetics*, 43 (4): 267-282
- Ocskó Z., Erdős Gy., Molnár J. (2013): Növényvédő szerek, termésmenvelő anyagok 2013 I. Budapest: Vidékfejlesztési Minisztérium, 570-630 p. és 663-665
- Orlob G. B. (1966): Feeding and transmission characteristics of *Aceria tulipae* Keifer as vector of wheat streak mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, 55 (3): 218-238
- Oswald J. W., Houston B. R. (1951): A new virus disease of cereals transmissible by aphids. *Plant Disease Reporter*, 35: 471-475
- Paliwal Y. C. (1979): Serological relationships of barley yellow dwarf virus isolates. *Journal of Phytopathology*, 94 (1): 8-15
- Palmer K. E., Rybicki E. P. (1998): The molecular biology of mastreviruses. *Advances in Virus Research*, 50: 183-234
- Papp M., Mesterházy Á. (1996): Resistance of winter wheat to cereal leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) and bird cherry-oat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 89 (6): 1649-1657
- Papp M., Mesterházy Á., Vasdinyei R., Gáborjányi R. (1996): Mixed virus infection of wheat in South East Hungary in 1994 and 1995. *Cereal Research Communications*, 24 (2): 179-182
- Papp M., Takács A., Gáborjányi R., Szabó Cs., Cseuz L., Mesterházy Á. (2011): Búza fajták vírusbetegségekkel szembeni rezisztenciája és a vírusok megoszlása. In: Kőmíves T., Haltrich A., Molnár J. (szerk.): *57. Növényvédelmi Tudományos Napok*, 2011. február 21-22. Budapest: Magyar Növényvédelmi Társaság, 23
- Pauk J., Hansch R., Schwarz G., Nerlich A., Monostori T., Mészáros A., Jenes B., Kertész Z., Matuz J., Schulze J., Mendel L. R. (1998): Transzgenikus búza

- (*Triticum aestivum* L.) előállítására Magyarországon. *Növénytermelés*, 47 (3): 241-251
- Pauk J., Hassan M. S., Puolimatka M., Lantos Cs., Mihály R., Mesterházy Á., Kertész Z., Matuz J. (2003): Microspore- and anther culture improvements for wheat breeding. In: Mujib A., Cho M. J., Predieri S., Banerjee S. (szerk.): *In Vitro Application in Crop Improvement: Recent Progress*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers Inc., 131-151
- Perring T. M., Gruenhagen N. M., Farrar C. A. (1999): Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annual Review of Entomology*, 44: 457-481
- Perry K. L., Kolb F. L., Sammons B., Lawson C., Cisar G., Ohm H. (2000): Yield effects of barley yellow dwarf virus in soft red winter wheat. *Phytopathology*, 90 (9): 1043-1048
- Peter K. A., Gildow F., Palukaitis P., Gray S. M. (2009): The C terminus of the poliovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of Virology*, 83 (11): 5419-5429
- Petty I. T. D., French R. Jones R. W., Jackson A. O. (1990): Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *The EMBO Journal*, 9 (11): 3453-3457
- Pfenning M., Pálfay G., Guillet T. (2008): The Clearfield® technology – A new broadspectrum post-emergence weed control system for European sunflower growers. *Journal of Plant Diseases and Protection*, XXI (Special Issue): 647-651
- Pinto Y. M., Kok R. A., Baulcombe D. C. (1999): Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nature Biotechnology*, 17 (7): 702-707
- Plumb R. T. (1974): Properties and isolates of barley yellow dwarf virus. *Annals of Applied Biology*, 77 (1): 87-91
- Pocsai E., Barabás Z. (1985): Wheat streak mosaic virus identifikálása Magyarországon. *Növényvédelem*, 21: 411
- Pocsai E., Murányi I. (2010): A búza törpeség vírus domináns szerepe a levélsárgulás és törpeség tünetet mutató őszi árpa nemesítési anyagokban. In: Lehoczky É. (szerk.): *XX. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum – Összefoglalók*, Keszthely: Pannon Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, 131-135
- Powell Abel A. P., Nelson R. S., De B., Hoffmann N., Rogers S. G., Fraley R. T., Beachy R. N. (1986): Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232 (4751): 738-743
- Power A. G., Gray S. M. (1995): Aphid transmission of barley yellow dwarf viruses: interactions between viruses, vectors and host plants. In: D'Arcy C. J., Burnett P. A. (szerk.): *Barley yellow dwarf – 40 years of progress*. St. Paul (MN, USA): The American Phytopathological Society Press, 259-289

- Pribék D. (1999): A vírusátvitel módszerei. In: Horváth J., Gáborjányi R. (szerk.): *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 91-138 p.
- Pribék D., Pocsai E., Szunics L., Vida Gy., Veisz O. (2006): Versenyfutás a vírusokkal – egy évtized tapasztalatai Martonvásáron. *Martonvásár*, 18 (2): 20-22
- Priszter Sz. (1999): *Növényneveink*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 1-547
- Rainbolt, C. R., Thill, D. C., Yenish, J. P. and Ball, D. A. (2004): Herbicide-resistant grass weed development in imidazolinone-resistant wheat: Weed biology and herbicide rotation. *Weed Technology*, 18 (3): 860-868
- Ranieri R., Lister R. M., Burnett P. A. (1993): Relationships between barley yellow dwarf virus titer and symptom expression in barley. *Crop Science*, 33 (5): 968-973
- Rao V. S. (2000): Principles of weed science. Enfield (NH, USA): Science Publishers Inc., 59-115 p. és 277-318
- Rasco-Gaunt S., Barcelo P. (1999): Immature inflorescence culture of cereals. In: Hall R. D. (szerk.): *Plant Cell Culture Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 71-81
- Rasmusson D. C., Schaller C. W. (1959): The inheritance of resistance in barley to the yellow-dwarf virus. *Agronomy Journal*, 51 (11): 661-664
- Riechmann J. L., Lain S., Garcia J. S. (1992): Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73 (1): 1-16
- Rines H. W., Stuthman D. D., Briggles L. W., Young V. L., Jedlinski H., Smith D. H., Webster J. A., Rothman P. G. (1980): Collection and evaluation of *Avena fatua* for use in oat improvement. *Crop Science*, 20 (1): 63-68
- Robertson N. L., French R., Gray S. M. (1991): Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology*, 72 (6): 1473-1477
- Rochow W. F. (1969): Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, 59 (11): 1580-1589
- Rochow W. F., Eastop V. F. (1966): Variation within *Rhopalosiphum padi* and transmission of barley yellow dwarf virus by clones of four aphid species. *Viorlogy*, 30 (2): 286-296
- Rojas M. R., Zerbini F. M., Allison R. F., Gilbertson R. L., Lucas W. J. (1997) Capsid protein and helper component proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, 237 (2): 283-295
- Sasaya T., Nakazono-Nagaoka E., Saika H., Aoki H., Hiraguri A., Netsu O., Uehara-Ichiki T., Onuki M., Toki S., Yatou O. (2014): Transgenic strategies to confer resistance against viruses in rice plants. *Frontiers in Microbiology*, (4) Article 409
- Schinko E., Schad K., Eys S., Kelle, U., Wohlleben, W. (2009): Phosphinothricin-tripeptide biosynthesis: An original version of bacterial secondary metabolism? *Phytochemistry*, 70 (15-16): 1787-1800

- Schmitz J., Stussi-Garaud C., Tacke E., Prufer D., Rohde W., Rohfritsch O. (1997): In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology*, 235 (2): 311-322
- Schwartz D., Berger S., Heinzlmann E., Muschko K., Welzel K., Wohlleben W. (2004): Biosynthetic gene cluster of the herbicide phosphinothricin tripeptid from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (12): 7093-7102
- Scofield S. R., Huang L., Brandt A. S., Gil B. S. (2005): Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the LR21-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiology*, 138 (4): 2165-2173
- Sebesta E. E., Young H. C., Porter D. R., Webster J. A. (1995): Registration of two wheat streak mosaic virus-resistant wheat germplasms. *Crop Science*, 35 (4): 1238
- Seifers D. L., Harvey T. L., Martin T. J., Jensen S. G. (1997): Identification of the wheat curl mite as the vector of the High Plains virus of corn and wheat. *Plant Disease*, 81 (10): 1161-1166
- Seifers D. L., Martin T. J., Harvey T. L., Fellers J. P., Michaud J. P. (2009): Identification of the wheat curl mite as the vector of Triticum mosaic virus. *Plant Disease*, 93 (1): 25-29
- Sharma H., Ohm H., Goulard L., Lister R., Appels R., Benlhabib O. (1995): Introgression and characterization of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Genome*, 38 (2): 406-413
- Sherwood J. L. (1987): Comparison of a filter paper immunobinding assay, western blotting and enzyme linked immunosorbent assay for the detection of wheat streak mosaic virus. *Journal of Phytopathology*, 118 (1): 68-75
- Silhavy D., Burgyán J. (2004): Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in Plant Science*, 9 (2): 76-83
- Siomi H., Siomi M. C. (2009): On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457 (7228): 396-404
- Singh R. P. (1993): Genetic association of gene Bdv1 for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes Lr34 and Yr18 for adult plant resistant to rusts in bread wheat. *Plant Disease*, 77 (11): 1103-1106
- Sivamani E., Brey C. W., Dyer W. E., Talbert L. E., Qu R. (2000): Resistance to Wheat streak mosaic virus in transgenic wheat expressing the viral replicase (Nib) gene. *Molecular Breeding*, 6 (5): 469-477
- Sivamani E., Brey C. W., Talbert L. E., Young M. A., Dyer W. E., Kaniewski W. K., Qu R. (2002): Resistance to Wheat streak mosaic virus in transgenic wheat engineered with the viral coat protein. *Transgenic Research*, 11 (1): 31-41
- Sivamani E., Huet H., Shen P., Ong C. A., de Kochko A., Fauquet C., Beachy R. N. (1999): Rice plant (*Oryza sativa* L.) containing Rice tungro spherical virus (RTSV) coat protein transgenes are resistant to virus infection. *Molecular Breeding*, 5 (2): 177-185

- Slykhuis J. T. (1953): Wheat streak mosaic in Alberta and factors related to its spread. *Canadian Journal of Agricultural Science*, 33: 195-197
- Slykhuis J. T. (1955): *Aceria tulipae* Keifer (Acarina: Eriophyidae) in relation to spread of wheat streak mosaic virus. *Phytopathology*, 45 (3): 116-128
- Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M. (2000): Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407 (6802): 319-321
- Stanley J. (1985): The molecular biology of geminiviruses. *Advances in Virus Research*, 30: 139-177
- Stanley J., Davis J. W. (1989): Structure and function of the DNA geminiviruses. In: Davis J. W. (szerk.): *Molecular Plant Virology*. Boca Raton (FL, USA): CRC Press, 191-218
- Stenger D. C., Hall J. S., Choi I. R., French R. (1998): Phylogenetic relationships within the family Potyviridae: wheat streak mosaic virus and brome streak mosaic virus are not members of the genus Rymovirus. *Phytopathology*, 88 (8): 782-787
- Strauch E., Wohlleben W., Pühler A. (1988): Cloning of a phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene*, 63 (1): 65-74
- Streber W.R., Willmitzer L. (1989): Transgenic tobacco plants expressing a bacterial detoxifying enzyme are resistant to 2,4-D. *Nature Biotechnology*, 7 (8): 811-816
- Sváb J. (1981): Biometriai módszerek a kutatásban. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 23-112 p. és 263-290
- Szabó M., Bocz E. (1996): A búzafajok elterjedése, jelentősége. In: Bocz E. (szerk.): *Szántóföldi növénytermesztés*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 212-215
- Szigeti Z., Lehoczki E. (2003): A review of physiological and biochemical aspects of resistance to atrazine and paraquat in Hungarian weeds. *Pest Management Science*, 59 (4): 451-458
- Szirmai J. (1967): Új vírusbetegség gabonaföldjeinken. *Magyar Mezőgazdaság*, 22: 19
- Szunics L., Szunics Lu. (1984): Az árpa sárga törpülés vírus kártétele a búzán. *Növényvédelem*, 20: 152-157
- Tachibana K., Watanabe T., Sekizawa Y., Takematsu T. (1986): Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *Journal of Pesticide Science*, 11 (1): 33-37
- Tai Y. S., Bragg J., Edwards M. C. (2005): Virus vector for gene silencing in wheat. *Biotechniques*, 39 (3): 310-314 p.
- Talbert L. E., Bruckner P. L., Smith L. Y., Sears R., Martin T. J. (1996): Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (3): 463-467
- Tan, S., Evans, R., Singh, B. (2006): Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, 30 (2): 195-204

- Tatineni S., Graybosh R. A., Hein G. L., Wegulo S. N., French R. (2010): Wheat cultivar-specific disease synergism and alteration of virus accumulation during co-infection with wheat streak mosaic virus and triticum mosaic virus. *Phytopathology*, 100 (3): 230-238
- Tatineni S., Sarath G., Seifers D., French R. (2013): Immunodetection of Triticum mosaic virus by DAS- and DAC-ELISA using antibodies produced against coat protein expressed in *Escherichia coli*: potential for high-throughput diagnostic methods. *Journal of Virological Methods*, 189 (1): 196-203
- Taylor N. J., Halsey M., Gaitan-Solis E., Anderson P., Gichuki S., Miano D., Bua A., Alicai T., Fauquet C. M. (2012): The VIRCA Project – Virus resistant cassava for Africa. *GM Crops and Food*, 3 (2): 93-103
- Thompson C. J., Movva N. R., Tizard R., Cramer R., Davies J. E., Lauwereys M., Botterman J. (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*, 6 (9): 2519-2523
- Toldi O., Tóth S., Oreifig A. S., Kiss E., Jenes B. (2000): Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through the application of phosphinothricin as growth regulator. *Plant Cell Reports*, 19 (12): 1226-1231
- Tripathi S., Suzuki J. Y., Ferreira S. A., Gonsalves D. (2008): Papaya ringspot virus-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology*, 9 (3): 269-280
- Ujvárosi M. (1973): Gyomirtás. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 25-34
- Vacke J. (1961): Wheat dwarf virus disease. *Biologia Plantarum*, 3 (3): 228-233
- Vacke J. (1964): Some new findings on wheat dwarf virus. In: *Plant Virology – Proceedings of the 5th Conference of the Czechoslovak Plant Virologists*. Prága: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, 331-334
- Vacke J., Cibulka R. (2000): Comparison of DAS-ELISA and enzyme amplified ELISA for detection of wheat dwarf virus in host plants and leafhopper vectors. *Plant Protection Science*, 36 (2): 41-45
- Vancetovic J., Vidakovic M., Babic M., Brankovic D., Radojicic S., Bozinovic M., Stevanovic M. (2009): The effect of cycloxydim tolerant maize (CTM) alleles on grain yield and agronomic traits of maize single cross hybrid. *Maydica*, 54 (1): 91-95
- Varsney A., Altpeter F. (2001): Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 8 (4): 295-309
- Vasil V., Castillio A. M., Fromm M. E., Vasil I. K. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryonic callus. *Nature Biotechnology*, 10 (6): 667-674.
- Velandia M., Rejesus R. M., Jones D. C., Price J. A., Workneh F., Rush C. M. (2010): Economic impact of wheat streak mosaic virus in the Texas High Plains. *Crop Protection*, 29 (7): 699-703
- Verchot J., Carrington J. C. (1995): Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*, 69 (6): 3668-3674

- Vincent J. R., Lister R. M., Larkins B. A. (1991): Nucleotid sequence analysis and genomic organization of the NY-RPV isolate of barley yellow dwarf virus. *Journal of General Virology*, 72 (10): 2347-2355
- Wakabayashi K., Böger P. (2002): Target sites for herbicides: entering the 21st century. *Pest Management Science*, 58 (11): 1149-1154
- Wang H. Y., Li Y. F., Xie L. X., Xu P. L. (2003): Expression of a bacterial *aroA* mutant, *aroA*-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. *Journal of Plant Research*, 116 (6): 455-460
- Wang M. B., Abbott D. C., Waterhouse P. M. (2000): A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Molecular Plant Pathology*, 1 (6): 347-356
- Wendler C., Putzer A., Wild A. (1992): Effect of glufosinate (phosphinothricin) and inhibitors of photorespiration on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. *Journal of Plant Physiology*, 139 (6): 666-671
- Wiese M. V. (1987): Compendium of wheat diseases. St. Paul (MN, USA): APS Press, 112 p.
- Wohlleben W., Arnold W., Broer I., Hillemann D., Strauch E., Pühler A. (1988): Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*, 70 (1): 25-37
- Xie Z., Johansen L. K., Gustafson A. M., Kasschau K. D., Lellis A. D., Zilberman D., Jacobsen S. E. Carrington J. C. (2004): Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2 (5) 642-652
- Xu S. J., Banks P. M., Dong Y. S., Zhou R. H., Larkin P. J. (1994): Evaluation of Chinese triticeae for resistance to barley yellow dwarf virus (BYDV). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 41 (1): 35-41
- Yemets A. I., Bayer O. A., Radchuk V. V., Blume Y. B. (2009): Agrobacterium-mediated transformation of flax with a mutant tubulin gene responsible for resistance to dinitroaniline herbicides. *Russian Journal of Genetics*, 45 (10): 1215-1222
- Yemets A. I., Radchuk V. V., Pakhomov A. V., Blume Y. B. (2008): Biolistic transformation of soybean using a new selectable marker gene conferring resistance to dinitroanilines. *Cytology and Genetics*, 42 (6): 413-419
- Young M. J., Kelly L., Larkin P. J., Waterhouse P. M., Gerlach W. L. (1991): Infectious in vitro transcripts from a cloned cDNA of barley yellow dwarf virus. *Virology*, 180 (1): 372-379
- Zhang Q. F., Guan W. N., Ren Z. Y., Zhu X. S., Tsai J. H. (1983): Transmission of barley yellow dwarf virus strains from northwestern China by four aphid species. *Plant Disease*, 67 (8): 895-899
- Zhang X., Sato S., Ye X., Dorrance A. E., Morris T. J., Clemente T. E., Qu F. (2011): Robust RNAi-based resistance to mixed infection of three viruses in

- soybean plants expressing separate short hairpins from a single transgene. *Phytopathology*, 101 (11): 1264-1269
- Zhang Z. Y., Wang Y. G., Shen X. J., Li L., Zhou S. F., Li W. C., Fu F. L. (2013): RNA interference-mediated resistance to maize dwarf mosaic virus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113 (3): 571-578
- Zhang Z. Y., Xin Z. Y., Ma Y. Z., Chen X., Xu Q. F., Lin Z. S. (1999): Mapping of a BYDV resistance gene from *Thinopyrum intermedium* in wheat background by molecular markers. *Science in China Series C: Life Sciences*, 42 (6): 663-668
- Zhang Z. Y., Xu J., Xu Q., Larkin P., Xin Z. (2004): Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (2): 433-439
- Zhou Q., Liu W., Zhang Y., Liu K. K. (2007): Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89 (2): 89-96

http 1:

www.itis.gov

http 2:

<http://talk.ictvonline.org/default.aspx>

http 3:

<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>

http 4:

www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_omn001a.html

http 5:

<http://pvo.bio-mirror.cn/sppindex.htm>

http 6:

www.forestryimages.org/images768x5120454048.jpg

http 7:

www.plantwise.org/Uploads/Compendia/Images/Normal/BYYDXX03.jpg

http 8:

www.kwizda.hu/files/karositolok/kartevoKB%20C3%BAza%20t%C3%B6rp%C3%BCI%C3%A9s%20v%C3%ADrus.jpg

http 9:

www.soilcropandmore.info/crops/WheatDiseasesoverview/WheatStreakMosaicVirus01.jpg

http 10:

www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/massruler-dna-ladder-mix-ready-to-use-80-10000-bp/

http 11:

www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/lambda-dna-ecori-plus-hindiii-marker/

http 12:

www.weedscience.org/Summary/MOA.aspx

M2. A kísérleteink során alkalmazott kitek használati protokollja

M2.1. Promega #Z3100 RNS-izoláló kit

1. Eppendorf csőben üvegbottal eldörzsölünk 30 mg levelet folyékony nitrogénben.
2. Hozzáadunk 175 µl lízis puffert és 350 µl dilúciós puffert. Óvatosan, forgatva keverjük, majd 16000-es fordulattal centrifugáljuk 10 percig szobahőmérsékleten (RT).
3. A pellet felszívása nélkül vágott végű pipettával új Eppendorf csőbe mérjük át a felülúszót, amelybe már előzőleg bemértünk 200 µl 95 %-os etanolt. Pipettával szuszpendáljuk 3-4-szer.
4. Az alkoholos mixet a kitben található 2 ml-es, speciális szűrővel ellátott, kupak nélküli csőbe mérjük át, majd 16000-es fordulattal centrifugáljuk 1 percig (RT).
5. A szűrőt leemeljük és a cső alján összegyűlt folyadékot eltávolítjuk, majd visszahelyezzük a szűrőt.
6. Hozzáadunk 600 µl RNS-mosó oldatot, majd 16000-es fordulattal centrifugáljuk 1 percig (RT).
7. Megismételjük az 5. lépést.
8. Közvetlenül a szűrőmembránra pipetázunk 50 µl frissen készített DNáz inkubációs mixet*. Inkubáljuk 15 percig, 20-25 °C hőmérsékleten.
9. Hozzáadunk 200 µl DNáz Stop oldatot és 16000-es fordulattal centrifugáljuk 1 percig (RT). Hozzáadunk 600 µl RNS-mosó oldatot, majd az előzőek szerint centrifugáljuk és megismételjük az 5. lépést.
10. Hozzáadunk 250 µl RNS-mosó oldatot, majd 16000-es fordulattal centrifugáljuk 2 percig (RT). Ezután csavaró mozdulattal eltávolítjuk a szűrő kupakját és áthelyezzük a kitben található 1,5 ml-es elúciós Eppendorf csőre.
11. Közvetlenül a szűrőmembránra pipetázunk 100 µl nukleázmentes vizet, majd nyitott kupakkal, 16000-es fordulattal centrifugáljuk 1 percig (RT).
12. A szűrőt eldobjuk, az elúciós Eppendorf csövet -80 °C-on tároljuk.

* Összemérjük a következőket (ebben a sorrendben): 40 µl „Yellow Core Buffer” + 5 µl 0,09M MnCl₂ + 5 µl DNáz I. enzim. Óvatosan, pipettával keverjük.

M2.2. Loewe Biochemica #07004 DAS-ELISA kit

A vizsgálatokhoz polisztirol mikrotitráló lapokat (Nunc Maxisorp) használunk. Minden cellába 200 µl, ún. felületbevonó pufferben 1:200 arányban oldott, nyúl vérsavójából származó BSMV-specifikus antitestet (immunoglobulin – IgG) pipetázunk.

1. Inkubáljuk a lemezeket 37 °C-on 4 órán át, így az IgG molekulák a polisztirolhoz kötődnek.
2. A nem kötődött IgG molekulákat négyszeri mosó pufferes öblítéssel eltávolítjuk. Minden alkalommal 200 µl puffert mérünk a mikrotitráló lapok mintahelyeibe és 3 percig állni hagyjuk.
3. Dörzsmozsárban eldörzsöljük a levélmintákat 1:10-1:20 arányú extrakciós puffer hozzáadásával (RT), s a kinyert présnedvből 200 µl-t a polisztirol lemez megfelelő cellájába pipetázunk. Egy éjszakán át 4 °C-on tartjuk a mintákat – ez alatt lehetővé válik az antigén-antitest-komplexek kialakulása.
4. Mosó pufferrel háromszor kimossuk a lemezt a 3. pontban leírtak szerint. Ezután 200 µl, ún. konjugációs pufferben 1:200 arányban oldott IgG-konjugátumot pipetázunk a cellákba és inkubáljuk a lemezt 4 órán át 37 °C-on, hogy kialakulhassanak a dupla antitest szendvicsek.
5. A nem kötődött konjugátumot háromszori mosó pufferes öblítéssel eltávolítjuk a 3. pontban leírtak szerint. Végül 200 µl, szubsztrát pufferben oldott, frissen készített szubsztrát oldatot mérünk be a cellákba.

Oldat neve	Összetevők	Elkészítés módja
Felületbevonó puffer	1,59 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃	desztillált vízben oldva és hígítva 1 literre; pH=9.6
Mosó puffer	8,0 g NaCl 2,9 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl 0,5 ml „Tween 20”	desztillált vízben oldva és hígítva 1 literre; pH=7.3
Extrakciós puffer		a kitben található
Konjugációs puffer	20 g polivinil-pirrolidon 2 g marha szérum albumin 0,1 g NaN ₃ 8,0 g NaCl 2,9 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,2 g KCl	desztillált vízben oldva és hígítva 1 literre; pH=7.4
Szubsztrát puffer	97 ml dietanol-amin 0,2 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O	desztillált vízben oldva és hígítva 1 literre; pH=9.8
Szubsztrát oldat	0,2 mg Na ₂ -para-nitro-fenil-foszfát (mintánként)	szubsztrát-pufferben oldva 1 mg·ml ⁻¹ -es koncentrációban

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Dolgozatom befejezéseként köszönetemet fejezem ki az alant felsoroltaknak:

A Szent István Egyetem Növénytudományi Doktori Iskolájában *Prof. Dr. Heszky László* akadémikus úr vezetése alatt folytathattam tanulmányaimat.

Kutatómunkám „A hazai nemesítésű búzák adaptációs képességének és termésbiztonságának javítása” (NKFP-4-038/2001) és „A magyar búza aszály- és fagyűrésznek, valamint betegség-ellenállóságának javítása növény-nemesítési, genomikai és biotechnológiai módszerekkel” (NKFP-4/064/04) című konzorciális nagyprojektekhez kapcsolódott, amelyek vezetője *Dr. Dudits Dénes* volt.

Kísérleteim megtervezése, kivitelezése, valamint az eredmények publikálása során témavezetőm, *Dr. Pauk János* látott el hasznos tanácsokkal. Mindig bátran támaszkodhattam *Dr. Mihály Róbert* és *Dr. Lantos Csaba* segítségére a genetikai transzformáció, a haploid technikák alkalmazása, a statisztikai kiértékelések és a fényképek készítése során. *Dr. Papp Mária* szívélyesen megengedte, hogy megfigyeléseket végezhsek és mintákat gyűjthessek vírusfertőzéseket provokáló tenyészkertjéből. A szövettenyésztés során nyújtott önzetlen segítségükkel *Kótai Éva*, *Kiss Orsolya* és *Fehérné Juhász Erzsébet* nagyban hozzájárultak a dolgozatban bemutatott eredmények eléréséhez. Szakirodalmak megszerzésében mindig számíthattam *Búza Lajosné* közreműködésére. Az üvegházi kísérleteknél *Vízi Sándor* végezte a növényápolási munkákat.

A vírusrezisztencia program keretében *Dr. Silhavy Dániel* RNS-biológia csoportja tervezte meg, készítette el és bocsátotta rendelkezésünkre a transzformációs vektormolekulákat és a primereket. A laboratóriumukban eltöltött három hónap alatt igen hasznos elméleti és gyakorlati ismereteket szereztem. *Dr. Kerényi Zoltán*, *Dr. Mérai Zsuzsa* és *Magna Melinda* időt és fáradságot nem kímélve ismertették meg velem a nukleinsavakkal végzett munka, a polimeráz láncreakciók és a hibridizációs technikák fortélyait.

A mesterséges vírusfertőzések kivitelezésében *Dr. Salamon Pál* segédkezett, és látott el szakmai tanácsokkal.

Nyitott ajtóra találtam *Dr. Takács András* keszthelyi kutatócsoportjánál, ahol *Dr. Cseh Eszter* és *Apró Melinda* közreműködésével elvégezhettem a dolgozatban ismertetett szerológiai tesztek.

Dr. Mesterházy Ákos, mint a házi védelem vezető elnöke, valamint *Dr. Jenes Barnabás* és *Dr. Szőke Antal* opponensek számos hibára rámutattak és javító szándékú véleményükkel jelentősen hozzájárultak dolgozatom végleges változatának elkészítéséhez.

Tóth Aretta készségesen korrektúrázta nemzetközi publikációim kéziratait.

Végül, de nem utolsó sorban családomnak, barátaimnak és az égieknek tartozok hálával, akik mindvégig támogatták hosszúra nyúlt tanulmányaimat és biztattak, hogy egyszer mégiscsak eljutok eddig a pontig.