



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

A biotechnológia és a vegyipar fejlődésével újabb és újabb vegyületek kapnak szerepet a gabonafélék gyomirtásában. Közöttük olyanok is, amelyek ún. széles spektrumú szerek, tehát toxikus hatásuk a kultúrnövényekre is kiterjed, amit abiotikus stresszként értelmezünk. Léteznek azonban rezisztenciagének, amelyekkel kivédhető a hatásuk, így ezek a herbicidek szelektívvé tehetők. Dolgozatom első részében egy ilyen gén hatását vizsgáltam meg egy modell búzatörzsből üvegházi körülmények között.

Az aminosav-bioszintézis a herbicidek által az egyik leggyakrabban támadott anyagszereút. Néhány évtizeddel ezelőtt a *Streptomyces viridochromogenes* és a *S. hygroscopicus* gombák által termelt speciális antibiotikumról, a PTT-ről (foszfinotricin-tripeptid) jelentek meg publikációk. A PTT molekula bioaktív komponense a PT, amely a glutaminsav szerkezeti analógjaként belépve az aminosavsintézis folyamatába irreverzibilisen gátolja a nitrogén-metabolizmus kulcsenzimét, a GS-t (glutamin-szintetáz). A GS ammónia felhasználásával katalizálja a glutaminsav → glutamin átalakulást. Gátlása révén a kontroll sejtekhez viszonyítva a glutaminsavszint és az ammónium-ion felhalmozódás akár százszoros értéket is elérhet. A PT hatással van számos más anyagszereútra is: módosítja a membrántranszportfolyamatokat, csökkenti a protein- és nukleotidkoncentrációt, valamint hatására foszfoglükolát, glikolát és glioxalát halmozódik fel, ami a fotoszintézis csökkenéséhez vezet (Schinko és mtsai, 2009). 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 nekروزis figyelhető meg, végül a növények elpusztulnak (Berzsenyi, 2011). A széles hatásspektrumú gyomirtószerekre a gyom- és a kultúrnövények is érzékenyek. Az ilyen herbicideket úgy lehet szelektívvé tenni, ha a gyomokhoz képest eltérő hatásmechanizmust alakítunk ki egy adott kultúrnövény genotípusban. Így a szelektivitás nem faj-, hanem fajtaspecifikus lesz.

A glufozinát-ammónium egy ún. proherbicid, amely a növényi sejtekbe jutva PTT-vé alakul, ezért a perzselő hatású növényirtók közé tartozik. 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 PTT-t, hogy acetilálja annak szabad aminocsoportját. A PAT-enzimet kódoló *pat* gént a *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 törzséből izolálták, míg az ugyanolyan hatást kiváltó *bar* (bialafosz rezisztencia) gént *S. hygroscopicus*-ból. Több kutatócsoport is sikerrel állított elő a glufozinát-ammóniummal szemben toleráns gabona genotípusokat (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 egyedében.

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 találhatóak. A kenyérbúza és vad roknainak keresztezésekor számos hátrányos tulajdonság kerülhet át a tenyésztésanyagba, bonyolulttá téve a szelekciót. Mindez kiküszöbölhető a kórokozók genomszekvenciáinak felhasználásával, amelyek indukálhatják a növényi sejt ősi géncsenedesítő mechanizmusát, az RNS-interferenciát. Munkám második szakaszában e rendszer hatékonyságát tanulmányoztam modell búzatorzseken szintén üvegházi körülmények között, illetve a polimeráz láncreakciókhoz kifejlesztett primerpárok szántóföldi vírusfertőzések diagnosztizálására való alkalmasságát vizsgáltam meg.

A *Triticum* fajok több mint ötven vírusra fogékonyak. Sokéves megfigyelések alapján Magyarországon leggyakrabban a BSMV (Barley stripe mosaic *hordeivirus* – árpa csíkos mozaik), a BYDV (Barley yellow dwarf *luteovirus* – árpa sárga törpülés), a WDV (Wheat dwarf *mastrevirus* – búza törpülés) és a WSMV (Wheat streak mosaic *tritimovirus* – búza csíkos mozaik) fordul elő. Az ellenük való védekezés leghatékonyabb módszere a rezisztencianemesítés. Az utóbbi évtizedben bebizonyosodott, hogy az RNS-interferencia jelensége hatékony módszere a vírusrezisztencia kialakításának. Az RNS-interferencia az eukarióta élőlényekben működő, dsRNS-ek (kétszálú RNS) által indukált ősi géncsenedesítési rendszer. A dsRNS-eket egy RNázIII-szerű nukleáz, a DICER 21-25 nukleotid méretű rövid darabokra vágja. Ezek a rövid siRNS-ek különböző csenedesítő komplexekhez kapcsolódnak és az interferencia szekvencia-specifikusságát biztosítják. Funkciójuk a komplexek elvezetése a velük komplementer nukleinsavakhoz azok specifikus vágása végett. Végeredményben a csenedesítés célpontjának számító mRNS genetikai információ-tartalma nem expresszálódik (Bapat, 2013). A vírusfertőzések aktiválják a sejt RNS csenedesítő rendszerét, mert a növény mind az RNS vírusok replikációs intermedierjeit, mind az egyszálú DNS-vírusok átfedő szensz-antiszensz transzkriptjeit dsRNS-ként értelmezi. A DICER-szerű enzimek a virális dsRNS-eket siRNS-ekké alakítják, amelyek a Watson-Crick-féle bázispárosodás szabályai szerint felismerik a sejtbe jutott patogén nukleinsavát, a csenedesítő komplexek pedig degradálják azt (Ding és Voinnet, 2007). Bár az RNS-interferencia hatékony antivirális rendszer, sok vírus mégis megfertőzi a növényeket, mert a vírusok RNS csenedesítést gátló fehérjéket is kódolnak, és mert a rendszer csak késleltetve aktiválódik, miután a vírus replikálódni kezdett (Mérai és mtsai, 2006). Amennyiben egy DNS-szakasz intronnal elválasztott, fordítva ismétlődő szekvenciákat tartalmaz, az arról átíródó mRNS hajtűformát vesz fel, és dsRNS-sé alakul. Az ilyen DNS-konstrukció a célmolekula teljes csenedesítését eredményezheti. Ha a fordítva ismétlődő szekvenciák virális eredetűek és konstitutív promóterrel szabályozottak, a DNS-t expresszáló növény immunissá válhat az adott kórokozóval szemben, mert a vírus nukleinsava még a replikáció megindulása előtt elbomlik (Fusaro és mtsai, 2006). Megvan tehát a lehetősége annak, hogy a hazánkban gyakran károsító gabonavírusok ellen immunis búzatorzseket hozzunk létre.

A vírusdiagnosztika történetében mérföldkőnek számított a szerológiai vizsgálatok kifejlesztése. Az ELISA-tesztet (enzyme linked immunosorbent assay – enzimhez

kötött immunválasz) az 1960-as évek végétől alkalmazzák. Az antigén-antitest reakció egy az antitesthez kapcsolt enzim segítségével követhető nyomon. A reakció-elegy színváltozásának mértéke arányos a keresett vírus koncentrációjával. Létezik indirekt és direkt eljárások, utóbbiak közé tartozik a DAS-ELISA (double antibody sandwich – kettős antitest szendvics). Akár fél nanogramm vírus is kimutatható vele, a növényvírusok diagnosztizálásában a legnépszerűbb szerológiai módszer, specifikus és igen pontos (Tatineni és mtsai, 2013). A fertőzések diagnosztizálása és a vírustaxonómia is újabb lehetőséggel bővült a nukleinsav alapú *in vitro* technikák fejlődésével. Hibridizációs és amplifikációs eljárásokkal mind a DNS, mind az RNS genommal rendelkező vírusok kimutathatók és jellemezhetők. A detektáláshoz szükséges a keresett kórokozó genomjának legalább részleges szekvenciaismerete. A PCR-alapú módszerek (polymerase chain reaction – polimeráz láncreakció) jó lehetőséget adnak szekvenciaspecifikus amplifikációra, mert akár pikogramm nagyságrendű kiindulási nukleinsav is elegendő az eredményhez. A PCR érzékenysége meghaladja az ELISA-tesztét, ami hátrányává is válhat, mert könnyen félrevezető következtetéseket lehet levonni a gélfotó alapján. A PCR ugyanis csak minőségi eredményt ad (igen/nem válasz), nem pedig mennyiségit, így a fertőzöttség mértékét nehéz megbecsülni. Továbbfejlesztett változata, a qRT-PCR (kvantitatív real time PCR) azonban ezt a hátrányt is kiküszöböli és a nukleinsavamplifikációt az egyik legmegbízhatóbb diagnosztikai módszerré teszi (Jarosova és Kundu, 2010).

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. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Széles spektrumú gyomirtószerrel szembeni rezisztencia vizsgálata

Glufozinát-ammóniummal kezeltünk egy detoxifikáló gént hordozó búzatörzset. Előzetesen meghatároztuk a hatóanyag letális dózisát. Vad típusú CY-45 búzatörzs (*Triticum aestivum* L.) terméseiből érett embriókat izoláltunk és *in vitro* csíráztattuk azokat 5 ml $\frac{1}{2}$ MS₀ táptalajon, kiegészítve 0, 1, 2 illetve 4 mg·l⁻¹ glufozinát-ammóniummal. Magát a rezisztencia tesztet a CY-45 eredetű „T-124” jelű búzatörzssel végeztük el, amely a konstitutív promóterrel szabályozott *bar* gént expresszáta. Az érett embriók csíráztatása során 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 kezelést nyolc ismétlésben végeztünk el. Három hetes szövettenyésztési periódus után a növénykéket talajba ültettük és zárt rendszerű üvegházban neveltük fel. A kalászokat egyenként arattuk le és vizuális értékelés alapján *jól termékenyült* és *rosszul termékenyült* csoportokba osztottuk. Betakarítás után mindkét csoportban megállapítottuk a növényenkénti kalászszaámot, a kalászonkénti szemszaámot, a növényenkénti termést és az ezerszemtömeget. 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 jól és a rosszul termékenyült kalászok eredményeit külön-külön elemeztük egytényezős varianciaanalízissel. A teljesen vagy részlegesen steril kalászok adatait nem hagytuk figyelmen kívül. 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 a 103613/4/2006 számú Engedélyező Határozat alapján készítettünk és a hatóságnak bemutattunk.

2.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata

Ehhez a kísérletsorozathoz a pBAJEN transzformációs vektormolekula hét változatát kaptuk meg a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont RNS-biológia csoportjától. A klónozó helyre intronnal összekapcsolt fordítva ismétlődő DNS-szekvenciákat építettek, amelyek az RNS-interferencia indukálása révén a hazánkban előforduló négy legjelentősebb gabonavírussal szemben biztosíthatnak rezisztenciát. E patogén eredetű szekvenciákat úgy állították elő, hogy a kórokozók néhány izolátumának részleges genomszekvenálása alapján klónozták azok legkonzervatívabb nukleinsav-régióit. Négy plazmid csak az egyik vírusnak megfelelő szekvenciákat hordozta, két másik egyszerre kettő kórokozó ellen lehet hatékony, míg a hetedik komplex módon mind a négy vírussal szemben védelmet nyújthat.

Munkánk során a CY-45 és a GK Tavasz genotípusokat alkalmaztuk (mindkettő CYMMIT-eredetű közönséges búza). Éretlen embriókat izoláltunk D₂ táptalajra a virágzás utáni 12-14. napon. A dedifferenciálódott kalluszokat 4 órával a géntranszfer előtt mannitollal kiegészített táptalajra raktuk át, s az így indukált ozmózis a sejtfalak fellazítása révén elősegítette a vektormolekulák célba érését. A transzformációs plazmidokat részecskebelövő készülékkel juttattuk be a célsejtekbe. Mivel valamennyi plazmid tartalmazta a konstitutív promóterrel szabályozott *bar* gént, a pozitív variánsokat glufozinát-ammóniummal szelektáltuk ki. A túlélő egyedeket zárt rendszerű üvegházban neveltük fel. Leveleiből genomi DNS-t izoláltunk a bejuttatott DNS-szekvenciák integrálódásának vizsgálatához, illetve összes RNS-t az expresszió ellenőrzéséhez. Előbbit hagyományos, utóbbit RT-PCR-rel végeztük. A primerek törzsoldatait a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontból kaptuk. A pozitív egyedeket felneveltük és termésüket betakarítottuk. Haploid technikát alkalmaztunk annak érdekében, hogy a kísérleti növényanyag homozigóta formában tartalmazza a bejuttatott szekvenciákat. Mivel a donor generáció a bejuttatott szekvenciákra nézve genetikailag még hasadt, a TDH (transzformáns dihaploid) növények előállításánál a donor diploid növényeket 3-4 leveles fenofázisban Finale 14 SL herbiciddel permeteztük le, s a portoktenyésztést kizárólag a túlélő egyedekből indítottuk. A folyamatot W14f kalluszindukációs és 190-2Cu regenerációs tápközegek alkalmazásával hajtottuk végre. A legalább 10 cm-es hajtást és erős gyökeret fejlesztett növénykéket tenyészedényekbe ültettük át és üvegházban neveltük fel. Vizuális minősítéssel kiválogattuk közülük az életerős szemterméseket nevelő, spontán dihaploid egyedeket és magfogásig neveltük azokat. Viaszerés fenofázisban minden törzsből kiválasztottuk a legtöbb termést ígérő növényeket (2-8 egyed), amelyek levélmintáiban RT-PCR-rel ismételtelen leellenőriztük a bejuttatott virális eredetű szekvenciák expresszióját.

A molekuláris tesztek során pozitív TDH búzatörzsek vetőmagját felszaporítottuk, s az egyszerre 4-féle vírus szekvenciáit expresszáló növények ellenállóképességét mesterséges BSMV-fertőzéssel vizsgáltuk meg zárt rendszerű üvegházi kabinban. Egy árpanövény erős kórképeket mutató fiatal hajtásaiból emulziót készítettünk, ezt használtuk fel a növények mesterséges inokulációjához. Előzetes vizsgálatunkban a vad típusú CY-45 és GK Tavasz búzákból 8-8 szemet vetettünk és a csíranövények felét 10 napos korban, egyleveles fenofázisban megfertőztük BSMV-vel. A növények másik felét vírusmentes árpából származó, de a fentiekkel azonos módon előkészített emulzióval inokuláltuk (mock kontroll). A vírusátvitel hatékonyságát három hét elteltével értékeltük ki az inokulált levél feletti második lombleveleken megjelenő tünetek pontozásával (1 = tünetmentes; 5 = igen erősen tünetes levél). 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 búzákat használtuk. Genotípusonként 20 szemet vetettünk el, 16-ot BSMV-vel inokuláltunk, 4 pedig mock inokulált kontrollként szolgált. A vetéstől számított 12-18. héten hetente felvételeztük az inokulált levél feletti negyedik lombleveleken észlelt tüneteket a fentiek szerint, valamint megmértük ugyanezen levelek SPAD (Soil Plant Analysis

Development) értékét, amely a klorofill tartalommal jól korreláló, mértékegység nélküli mutató. A vetéstől számított 18. héten véletlenszerűen kiválasztottunk 4 BSMV-vel inokulált és 1 mock inokulált növényt, amelyek víruskoncentrációját DAS-ELISA módszerrel határoztuk meg. Ha egy minta extinkciós értéke a kitben található negatív kontroll értékének a háromszorosát, azaz a 0,7-es határértéket meghaladta, akkor tekintettük az adott mintát a BSMV-re nézve pozitívnak. A növényeket magfogásig neveltük, betakarításkor megmértük magasságukat, a kalász-hosszt (több kalász esetén a főhajtás kalászának hosszát), a növényenkénti termést, illetve az ezerszemtömeget. A klorofilltartalom-mérés adatait kétváltozós lineáris regresszióanalízissel elemeztük. Meghatároztuk a korrelációs koefficiens becslést értékét, valamint a regressziós egyenletet. Elvégeztük a mock inokulált és a vírussal inokulált növénycsoportban kiszámított regressziós koefficiensnek szignifikanciavizsgálatát is. A betakarítás után meghatározott agronómiai adatok tekintetében a mock inokulált, valamint a vírussal inokulált növények csoportjában a vad típusú kontroll és annak TDH változatai között kapott különbségek statisztikai elemzését egytényezős varianciaanalízissel végeztük. Az egyes genotípusokon belül a mock inokulált kontroll és a vírussal inokulált növények között kapott különbségeket középérték analízissel értékeltük ki. A BSMV-vel inokulált csoportban előforduló steril növények adatait nem hagytuk figyelmen kívül.

2.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel

Célunk volt annak megállapítása, hogy a vírusrezisztencia program keretében a vektorkonstrukciók nyomon követésére kifejlesztett primerek alkalmasak-e vírusdiagnosztikai vizsgálatokra, valamint a szerológiai és a molekuláris detektálás érzékenységének összehasonlítása. Tizenkét államilag elismert szegedi őszi búzafajta (Élet, Garaboly, Kalász, Verecke, Ati, Tisza, Békés, Csillag, Petur, Hattyú, Holló és Piacos) vírushordozottságát teszteltük le. Egy korai (október első dekádja) és egy késői (november első dekádja) vetésidőt alkalmaztunk. A fajtákat kétsoros parcellákba vetettük el a tenyészkertben, dupla gabona sortávolságra. Parcellánként két növény véletlenszerű kiválasztásával április végén begyűjtöttük a levélmintákat, 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. A szerológiai tesztek során BSMV-re, BYDV-re, WDV-re és WSMV-re specifikus antiszérumokat használtunk fel és az előző fejezetben leírtak szerint tekintettük fertőzöttnek az egyes mintákat. A molekuláris vizsgálatok előtt a levelek egyik feléből genomi DNS-t, a másikkól összes RNS-t izoláltunk. 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 végeztünk. 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).

3. EREDMÉNYEK

3.1. Széles spektrumú gyomirtószerrel szembeni rezisztencia vizsgálata

Elsőként meghatároztuk a glufozinát-ammónium letális dózisát a vad típusú CY-45 búzatörzs embrióinak *in vitro* csíráztatásával. Csak azok az embriók csíráztak ki, amelyeket herbicidmentes táptalajra helyeztünk, míg 1-4 mg·l⁻¹-es glufozinát-ammónium tartalmú táptalajon az embriók sem gyökeret, sem hajtást nem fejlesztettek. Esetünkben a herbicid letális dózisa tehát 1 mg·l⁻¹ alatti volt.

A herbicidrezisztencia teszt során használt „T-124” búzatörzs nem hasadt a *bar* génre nézve, amit RT-PCR-rel is alátámasztottunk. Minden embrió kicsírázott herbicidterhelés mellett is, így a tesztet 112 növényel végeztük el. Az embriók azonos intenzitással csíráztak, de 5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammónium már lassította a folyamatot, ami három héttel megnövelte a tenyészidőt. Felneveltük mindegyik növényt, és 773 darab kalászt (100 %) takarítottunk be. A szemek kiteltsége szerint két csoportra osztottuk a kalászokat: jól termékenyült 311 darab (40,2 %), rosszul termékenyült 462 darab (59,8 %). Részlegesen 19 kalász (2,4 %), teljesen 7 kalász (0,9 %) bizonyult sterilnek. A jól termékenyült csoportban a növényenkénti kalászszám 2,38 és 3,13 között változott, ami nem jelentett szignifikáns eltérést. Ugyanez a paraméter a rosszul termékenyült csoportban a három legmagasabb koncentrációjú kezelés hatására látványosan megnövekedett. A legintenzívebb hajtásfejlődés 5000 mg·l⁻¹ herbicid hatására következett be, ezeken a növényeken erőteljes bokrosodást figyeltünk meg. 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. A rosszul termékenyült csoportban a kalásonkénti szemszám 21,56 és 12,65 között alakult, ami három szignifikancia szintnek felelt meg. A két csoport az ezerszemtömegben különbözött leginkább egymástól. A jól termékenyült kalászok esetében 37,19 g és 28,21 g között változott, míg a másik csoportban 29,84 g és 16,92 g között alakult. Előbbi három, utóbbi négy szignifikancia szintnek felelt meg. A termés 2,15 g és 1,43 g között változott a jól termékenyült kalászok esetében, míg 2,18 g és 1,03 g között a másik csoportban. A növényenkénti teljes termés 4,32 g és 2,64 g között alakult. A kontroll növényekhez képest a 128-5000 mg·l⁻¹ glufozinát-ammóniummal kezelték – kivéve az 1000 mg·l⁻¹-es kezelést – termése 3 g alá csökkent, ami szignifikáns változást jelentett.

3.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata

A pBAJEN plazmid hét változatának búza sejtekbe juttatásához 12250 db CY-45 eredetű és 300 db GK Tavasz eredetű éretlen embriót izoláltunk. A *bar* markergénre alapozott szelkció *in vitro* fázisát követően 673 növényt ültettünk ki üvegházba, amelyekből 486-ot tudtunk felnevelni. Finale 14 SL kezelést követően 117 növé-

nyünk maradt, amelyekről PCR technikával megállapítottuk meg, hogy az integrálódott célszekvenciák mindegyike expresszáldott is, a szensz- és antiszensz orientációban beépült DNS-szakaszok pedig mindig együttesen voltak jelen – tehát az RNS interferencia működésének alapjául szolgáló dsRNS-ek kialakulásának nem volt elvi akadálya. A molekuláris tesztelés során 44 pozitív növényt kaptunk, amelyekről 628 szemet takarítottunk be. Mivel célunk volt a növények rezisztenciájának megismerése, ezért szelektív portoktenyésztés alkalmazásával 21 CY-45 és 1 GK Tavasz eredetű búzatörzs TDH változatát állítottuk elő, amelyek homozigóta formában tartalmazzák a beépített szekvenciákat. Az *in vitro* regenerálódott növénykéket üvegházba ültettük ki. Fejlettségük, terméskötődésük alapján elkülönítettük a haploidokat és a spontán dihaploidokat. Összesen 381 TDH búzanövényt állítottunk elő. Viaszerés fenofázisban minden törzsből kiválasztottunk néhány egyed, amelyeknél ismételtelen leellenőriztük a bejuttatott virális szekvenciák átíródását. A molekulárisan jellemzett 91 növény 97 %-a expresszálda a célszekvenciákat, tehát sikeres volt a *bar* génre alapozott szelekció.

A növényanyag előállítását követően megvizsgáltuk a 4-féle vírus szekvenciáit hordozó 243-as és 249-es búzatörzsek BSMV-vel szembeni rezisztenciáját. A mesterséges fertőzési rendszer hatékonyságát vad típusú CY-45 és GK Tavasz növényeken teszteltük. Az inokulációt követő harmadik héten valamennyi mock inokulált egyed tünetmentes volt, míg a BSMV-vel inokulált egyedeken megjelentek a vírus által okozott tipikus tünetek. Fertőzési módszerünkkel tehát a BSMV hatékonyan átvihető volt mind CY-45, mind pedig GK Tavasz búzafajtákra, ezáltal lehetővé vált a TDH növények ellenállóképességének objektív vizsgálata. A rezisztencia tesztre a 243-1, 243-3, 243-4 (GK Tavasz eredetűek), és a 249-3, 249-4, 249-8 (CY-45 eredetűek) törzseket jelöltük ki. A vetéstől számított 12-18. hét között hetente felvételeztük a kórképeket. Mock inokulált növényeink tünetmentesek maradtak. A BSMV-vel inokulált vad típusú búzafajták levelein igen erős tünetek jelentkeztek. GK Tavasz esetében az első megfigyelés alkalmával a 16 növény átlagos pontszáma ötfokozatú skálán 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. Ehhez képest valamennyi TDH növény teljesen tünetmentes volt a kísérlet kezdetekor és 85 %-uk az is maradt a megfigyelési periódus végéig. A 18. héten megfigyelt átlagos pontszámok 1,06 és 1,44 között változtak, alig haladták meg a mock inokulált kontrollok adatait. A vírustünetek felvételezésére kiválasztott levelek fotoszintetikus aktivitását gyorsmérővel vizsgáltuk meg. A SPAD értékek jól követték a tünetek felvételezésekor rögzített pontszámokat. A mock inokulált növények klorofilltartalma szinte teljesen megegyezett: 40 körüli értékeket mértünk, s a hét hetes periódus alatt az adatok csak minimális ingadozást mutattak. A BSMV-vel inokulált vad típusú búzafajták klorofilltartalma azonban már a 12. héten alacsonyabb volt, mint a mock inokulált kontrolloké, 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. A vírussal inokulált TDH búzatörzsek fotoszintetikus aktivitása a saját mock inokulált kontrollokhoz viszonyítva nem, vagy csak kismértékben változott. Kétfázisú lineáris regresszió-analízissel megállapítottuk,

hogy a vírussal való inokuláció hatására a regressziós koefficiens értéke szignifikánsan kevésbé csökkent le a TDH törzsek esetében, mint a GK Tavasz, illetve a CY-45 búzák esetében, vagyis a vad típusú kontrollok statisztikailag is eltérően viselkedtek, mint a TDH növények. Minden genotípusból véletlenszerűen kiválasztottunk egy mock inokulált és négy vírussal inokulált növényt, amelyek BSMV-koncentrációját meghatároztuk DAS-ELISA módszerrel. A tapasztalt tünetek és SPAD-értékek összhangban voltak az extinkciós értékekkel. Valamennyi mock inokulált növény fertőzésmentesnek bizonyult, esetükben 0,367-0,533 közötti értékeket detektáltunk. A BSMV-vel inokulált vad típusú búzatörzsek egyedei erősen fertőzöttek voltak, víruskoncentrációjuk 1,000 fölött alakult. A CY-45 eredetű TDH-növények közül egy sem bizonyult fertőzöttnek. 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, ez fertőzésre utal. A 243-4 törzs 2 növénye éppen átlépte a 0,7-es határértéket, egy harmadiknál pedig 0,662-t mértünk, ami a fertőzöttség szintjét alulról közelítette. Közvetlenül a betakarítás előtt felvételeztük a növények magasságát. A mock inokulált vad típusú GK Tavasz és CY-45 egyedek 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 mértünk. A vírussal inokulált TDH törzsek átlagos fejlettsége és magassága hasonlóképpen alakult a vad típusú mock inokulált kontrolloknál leirtakkal. Megjegyezzük azonban, hogy a 18. héten tünetesnek, illetve fertőzöttnek elkönnyvelt 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. A fordítva ismétlődő szekvenciákat nem tartalmazó GK Tavasz és CY-45 növényeknél a kaláshossz 55 mm körüli értékről 30 mm-re esett vissza a BSMV-vel történt inokuláció hatására. A TDH törzsek esetében – a néhány beteg növénytől eltekintve – nem találtunk 12 mm-nél nagyobb különbséget egy adott törzs mock inokulált és vírussal inokulált változata között. 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, vírussal inokulált TDH törzseknél 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 alatti terméseredmény is. A CY-45 fajta 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 kétfelével több volt a steril növények száma, és a fertilitésnél 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. 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 tör-

tént inokuláció hatására a vad típusú GK Tavasz átlagos ezerszemtömege 18 g-mal, a CY-45 fajtáé pedig 23 g-mal csökkent a mock inokuláltakhoz képest, míg a TDH törzseknél csak 1-5 g-mal volt alacsonyabb a kontrollokhoz viszonyítva. Egytényezős varianciaanalízissel megállapítottuk, hogy a mock inokulált növények csoportjában a vad típusú kontroll és TDH változatai között mért különbség egyik természetalkító komponens esetében sem volt szignifikáns, vagyis sem a GK Tavasz, sem a CY-45 genotípus megvizsgált tulajdonságai nem változtak meg a bejuttatott fordítva ismétlődő szekvenciák hatására. Másrészt igazoltuk, hogy a vírussal inokulált TDH törzsek és vad típusú fajták eredményei között tapasztalt eltérések statisztikailag szignifikánsak voltak, tehát a fordítva ismétlődő szekvenciákat expresszáló TDH törzsek minden paraméter esetében eltérő reakciókat mutattak a szekvenciákat nem tartalmazó genotípusokhoz képest. Egy-egy genotípuson belül a mock inokulált kontroll és a vírussal inokulált növények közötti különbségek elemzésével megállapítottuk, hogy a vad típusú kontrolloknál a BSMV-vel történt inokuláció minden tulajdonságban statisztikailag igazolható leromlást okozott. A 249-4 és a 249-8 törzsek kalászhossza szintén szignifikáns csökkenést mutatott – ezt leszámítva a TDH törzseknél nem kaptunk szignifikáns eltérést a kontroll és a kezelt csoportok átlagadatai között a BSMV hatására.

3.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel

A kettéválasztott levélminták egyik felét DAS-ELISA módszerrel vizsgáltuk meg. A késői vetésű növényanyagánál csak egyetlen fajta, az Élet esetében tudtunk kimutatni BYDV fertőzöttséget, míg BSMV, WDV és WSMV fertőzést egyetlen mintában sem detektáltunk. Ezzel szemben a korai vetésű növények 46 %-ában fordult elő a BYDV. Mindkét vizsgált növényegyedben kimutattuk a vírust a következő három fajta esetében: Garaboly, Kalász, Ati. A két egyed közül egyik fertőzöttnek bizonyult a következő öt fajtánál: Élet, Verecke, Békés, Holló, Piacos. Mindkét vizsgált egyed fertőzésmentes volt négy fajta esetében: Tisza, Csillag, Petur, Hatytyú. A másik három vírus a korai vetésű növényanyagban is sokkal kisebb gyakorisággal fordult elő. WSMV fertőzést a Holló és a Piacos fajtákban mutattunk ki, WDV fertőzést pedig a Piacos egyik egyedében. BSMV-t egyáltalán nem detektáltunk. Két fajta, a Holló és a Piacos kevert fertőzést mutatott. Előbbiben BYDV és WSMV, utóbbiban WDV, BYDV és WSMV egyaránt előfordult a mintavétel idején. Mivel szinte csak a BYDV fordult elő a vizsgált mintákban, három hét elteltével újabb leveleket gyűjtöttünk célzottan a korai vetésű parcellák tünetes növényeiről, hogy alaposabban összehasonlíthassuk vizsgálati módszereinket. BSMV-t 1, BYDV-t 16, WDV-t 7, WSMV-t pedig 6 mintában detektáltunk. Kevert fertőzés 9 esetben fordult elő. A levélminták másik felét PCR módszerrel vizsgáltuk meg. A vírusspecifikus primerekkel történő polimeráz láncreakciók kiértékelésekor a késői vetésű növényanyagánál 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

kórokozót 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 meg-egyeznek 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. A második mintavétel alkalmával gyűjtött erősen tünetes levelekből mind a négy kórokozót ki tudtuk mutatni: a BSMV-t 1, a BYDV-t 18, a WDV-t 13, a WSMV-t pedig 14 esetben. A PCR eredmények egy kivétellel alátámasztották a szerológiai teszt eredményeit, ugyanakkor megmutatkozott a molekuláris detektálás érzékenyebb volta is, mivel 19 esetben ott is kapunk jelet, ahol az ELISA szerint a minta nem volt fertőzött.

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 dóziséhoz 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 ezerszemtömege 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.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. Széles spektrumú gyomirtószerrel szembeni rezisztencia vizsgálata

Előkísérletünkben kevesebb, mint $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ glufozinát-ammónium jelenléte a táptalajban elegendő volt a CY-45 búzatorzs 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, CY-45 eredetű „T-124” búzatorzs növényeként életük első három hete során glufozinát-ammónium 14 különböző koncentrációjával kezeltük ugyancsak *in vitro*. A magasabb koncentrációjú kezelések szignifikáns változásokat okoztak a terméskialakító komponensekben. 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 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 tenyészidőhosszabbodást. A szubletális dózisú PTT stimulálta az *in vitro* hajtásregenerációt szőlő (Hébert-Soulé és mtsai, 1995), tátika (Hoshino és Mii, 1998) és rizs (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 kalászokat eredményezett. A kalásonkénti szemszám csökkenését főként a kalászok rövidülésével magyarázhatjuk, illetve közrejátszott a 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 kalászsám, valamint a kalásonkénti szemszám stabil maradt és ellensúlyozta az ezerszemtömeg csökkenését. A rosszul termékenyült kalászok 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 dózisonál megfordult és a termésértékek visszatértek a kontroll növények szignifikancia szintjére. A csökkenés az ezerszemtömeg és a kalásonkénti szemszám változásainak következménye volt, míg a növekedést a növényenkénti kalászsám 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 kalászok 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 búzafajtaéhoz 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 terméscsökkenést. 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 (Gopalakrishnan és mtsai, 2000; Manickavasagam és mtsai, 2004).

Úgy véljük, hogy a megfigyelt nagymértékű herbicidrezisztencia esetleges gyakorlati hasznosítása csak nagy körültekintéssel történhet, mert alacsony szelekciós nyomás alatt gyorsan kialakulhatnak rezisztens gyompopulációk is, túl nagy permetlé-koncentrációt alkalmazni pedig gazdaságtalan és környezetszennyező. Eredményeinknek mégis nagy elméleti jelentőséget tulajdonítunk, hiszen ha a *bar* gént egyéb stresszekkel (pl. szárazság- vagy fagyűrés) szemben rezisztenciát eredményező DNS-szekvenciával helyettesítjük és az jelen kísérletünkhöz hasonló mértékű ellenállóképességhez vezet, akkor sok, a mai mezőgazdaságot érzékenyen érintő probléma oldódhat meg.

4.2. Vírusfertőzéssel szemben ellenálló búzatörzsek létrehozása és vizsgálata

Kísérletsorozatunkban hétféle vektormolekulával dolgoztunk, amelyek az RNS-interferencia elvén a BSMV, BYDV, WDV és WSMV vírusokkal, vagy azok kombinációival szemben rezisztenciát indukálhatnak. A *bar*⁺ T₀ növényekre vonatkoztatva 1,02 %-os, míg a célgénre pozitív fertilis T₀ növényekre vonatkoztatva 0,33 %-os transzformációs gyakoriságot sikerült elérnünk. Ez a hatékonyság a nemzetközi publikációkban közölt 0,1-5,0 %-os határok közé esik (Bhalla és mtsai, 2006). Mivel célunk volt az előállított növények kórtani tesztelése is, portoktenyésztéssel homogénné tettük a búzatörzseket, hogy ne kelljen számolni a tenyésztésanyag genetikai hasadásával. A kalászosokra kidolgozott haploid technika eredményes műltra tekint vissza laboratóriumunkban. Csoportunk az elsők között bizonyította, hogy az *in vitro* androgenézis 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 marker-

gén és a célszekvenciák együttesen öröklődtek, sikeres volt a szelekciós fázis, és maga a portoktenyésztés is.

A négy vírus szekvenciáit szimultán hordozó dihaploid 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 legfeljebb közepes erősségű kórképeket regisztráltunk. Megmértük a levelek SPAD-értékét is, amely a klorofilltartalomról, ezáltal a fotoszintézis intenzitásáról nyújtott objektív információt. Statisztikailag értékelve az adatokat megállapítottuk, hogy a mock inokulált kontrollokhoz viszonyítva a vad típusú kontrollok fotoszintetikus aktivitása a BSMV hatására szignifikánsan lecsökkent, míg a TDH törzseknél tapasztalt változás nem volt szignifikáns. 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. Betakarításkor megvizsgáltuk a növénymagasság, a kaláshossz, az ezerszemtömeg és a termés alakulását. A mock inokulált vad típusú búzáék és a TDH növények közötti különbség nem volt szignifikáns, tehát a transzformációs vektormolekula beépítése nem volt hatással a vizsgált terméskialakító komponensekre. Másrészt igazoltuk, hogy a vírussal inokulált TDH törzsek és vad típusú búzáék 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 várokozásainknak megfelelően szignifikánsak voltak, míg a TDH törzseknél nem – kivéve a kaláshossz csökkenését a 249-4 és a 249-8 jelű növényeknél. Egyes genotípusok adatai nagy szórást mutattak. Véleményünk szerint ez epigenetikai hatás, vagy a vírus által generált interferenciagátlás következménye volt, amely növényenként más-más szinten jelentkezett. A növényvírusok e képessége intenzíven tanulmányozott (Bragg és Jackson, 2004). Számos kétszikű növényben vitték már sikerre az RNS-interferenciát vírusrezisztencia kialakítása céljából, egyszikűekben viszont jóval kevesebb eredményt publikáltak eddig. A dolgozat 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; Fahim és mtsai, 2010). Az intronnal elválasztott fordítva ismétlődő szekvenciákat tartalmazó vektorkonstrukciók lehetővé

teszik több vírussal szembeni rezisztencia kialakítását ugyanabban a növényben akár szimultán inokuláció esetén is (Bucher és mtsai, 2006; Zhang és mtsai, 2011). 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 elviekben BYDV-, WDV- és WSMV-fertőzéssel szemben is ellenállóak, de ez további bizonyítást kíván.

4.3. Vírusfertőzések detektálása szerológiai és molekuláris módszerekkel

A célkitűzésekben megfogalmazott kérdéseinkre pozitív választ kaptunk, mivel a primerek alkalmasnak bizonyultak PCR-alapú vírusdiagnosztikai célokra. A PCR alátámasztotta az ELISA adatokat, ezzel meg tudtuk erősíteni a korábban búzában, árpában és zabban publikált hasonló eredményeket (Robertson és mtsai, 1991; Figueira és mtsai, 1997; Mumford és mtsai, 2004). A reakciók optimalizálásával lehetővé vált három RNS-vírus szimultán vizsgálata is. 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 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 szezónban a BYDV volt a domináns vírus. Feltehetően kedvezett a különösen enyhe őszi időjárás a levéltetvek megtelepedésének, amelyek késő októberig táplálkoztak. Kabócákat és atkákat viszont 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. 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). A kísérletben részt vett búzafajták fogékonyságbeli különbségét ilyen kevés számú minta alapján nem lehet hitelt érdemlően jellemezni. Tanulmányunknak ez nem is volt célja, csak a módszertani összehasonlításra koncentráltunk.

IRODALOMJEGYZÉK

- Bapat V. A. (2013): Recent advances in ribonucleic acid interference (RNAi). *National Academy Science Letters - India*, 36 (1): 1-8
- Berzsenyi Z. (2011): 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
- 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
- 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
- Ding S. W., Voinnet O. (2007): Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130 (3): 413-426
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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., 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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., 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
- 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.
- 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
- 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

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

Lektorált nemzetközi folyóiratokban megjelent közlemények

Áy Z., Mihály R., Cserhádi M., Kótai É., Pauk J. (2012): The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) constitutively expressing the bar gene. *The Scientific World Journal*, pp. 1-9; doi: 1100/2012/657945. IF=1,73

Áy Z., Takács A., Papp M., Gáborjányi R., Silhavy D., Pauk J., Kertész Z. (2008): Detection of cereal viruses in wheat (*Triticum aestivum* L.) by serological and molecular methods. *Cereal Research Communications*, 2: 215-224.

Lektorált hazai folyóiratokban megjelent közlemények

Áy Z., Kerényi Z., Papp M., Silhavy D., Pauk J. (2007): Vírusok kimutatása búzában PCR technikával. *Agrár- és Vidékfejlesztési Szemle*, 2: 101-109.

Nem lektorált hazai folyóiratokban megjelent közlemények

Áy Z. (2007): Az őszi búza „titokzatos” kórokozói. *Agrofórum Extra*, 21: 10-11.

Lektorált nemzetközi konferencia kötetek

Áy Z. (2008): Viral diseases on wheat: diagnosis and protection. In: Proceedings of the *International Scientific Conference on Multifunctional Agriculture*, p. 23. Hódmezővásárhely, Hungary.

Nem lektorált nemzetközi konferencia absztraktok

Áy Z., Magna M., Kótai É., Kerényi Z., Silhavy D., Pauk J. (2009): Integration of RNA interference into wheat breeding: production of virus resistant wheat lines. In: Book of Abstracts; *Plant Breeding and Biotechnology in the Great Pannonian Region – Progress and Perspectives*, p. 29. Ljubljana, Slovenia.

Nem lektorált hazai konferencia absztraktok

Papp M., Gáborjányi R., Takács A., Szabó Cs., Áy Z., Kertész Z., Matuz J. (2008): Búza genotípusok vírusbetegségekkel szembeni ellenállóképességének jellemzése DAS-ELISA szerológiai módszerrel. *XIV. Növénynevelési Tudományos Napok – Összefoglalók*, p. 88. Budapest, Magyarország.

Áy Z., Kótai É., Magna M., Kerényi Z., Papp M., Silhavy D., Pauk J. (2007): Vírusrezisztencia kialakítása búzában géntechnológiával. *XIII. Növénynevelési Tudományos Napok – Összefoglalók*, p. 61. Budapest, Magyarország.

Áy Z., Pauk J. (2006): Herbicidrezisztencia-génnel transzformált tavaszi búza ellenállóságának vizsgálata in vitro és in vivo körülmények között. *XII. Növénynevelési Tudományos Napok – Összefoglalók*, p. 23. Budapest, Magyarország.