

**SZENT ISTVÁN
EGYETEM**

GÖDÖLLŐ

**BÚZA TÖRPÜLÉS VÍRUS REZISZTENCIA
KIALAKÍTÁSA ÁRPÁBAN MESTERSÉGES
miRNS FELHASZNÁLÁSÁVAL**

Doktori (PhD) értekezés

KIS ANDRÁS

Gödöllő
2018.

A doktori iskola

megnevezése: Növénytudományi Doktori Iskola

tudomány ága: Növénytermesztési- és kertészeti tudományok

vezetője: **Dr. Helyes Lajos, PhD**
egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezetők: **Dr. Jenes Barnabás, PhD**
főosztályvezető
MTA Titkársága, Kutatóintézeti Főosztály

Dr. Bán Rita, PhD
egyetemi docens
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Növényvédelmi Intézet

.....
Dr. Helyes Lajos
iskolavezető

.....
Dr. Jenes Barnabás
témavezető

.....
Dr. Bán Rita
témavezető

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS.....	7
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1	Az árpa eredete és termesztésének jelentősége	9
2.2	Az árpát megbetegítő vírusok.....	9
2.3	A <i>Geminiviridae</i> család	10
2.3.1	A búza törpülés vírus (WDV) jellemzése	11
2.3.2	A WDV vektora, a csíkos gabonakabóca.....	13
2.3.3	A WDV elterjedése és az általa okozott tünetek	14
2.3.4	WDV okozta gazdasági károk és az ellene történő védekezés.....	15
2.4	Az RNS interferencia különböző útvonalai növényekben	16
2.4.1	A miRNS útvonal.....	18
2.4.2	A siRNS útvonal	20
2.4.3	Az RNS interferencia hőmérsékletfüggősége	20
2.5	Az RNS interferencia felhasználása célzott géninaktivációra.....	21
2.5.1	Antiszensz-gén technológia	21
2.5.2	Inverted repeat (IR) technológia	22
2.5.3	Mesterséges miRNS (amiRNS) technológia.....	22
2.5.3.1	Az amiRNS technológia felhasználása növényi vírusokkal szemben.....	24
2.6	A növényi kis RNS-ek humánbiológiai hatásai.....	25
2.7	miRNS-ek keresése új generációs szekvenálással.....	26
2.8	Az árpa <i>Agrobacterium</i> - közvetítette transzformációja.....	27
2.9	DNS vírus átviteli rendszerek.....	29
2.9.1	Vírus átvitel közvetett és közvetlen biotechnológiai módszerekkel	29
2.9.2	Vírus átvitel rovar vektorral	31
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	32
3.1	Növényi anyagok.....	32
3.2	Vírusvektorok nevelése	32
3.3	Molekuláris munkák.....	32
3.3.1	<i>Escherichia coli</i> baktérium törzsek nevelése és plazmid kinyerés.....	32
3.3.2	DNS kivonás és PCR	33
3.3.3	DNS emésztés	33
3.3.4	DNS elektroforézis és DNS visszaizolálás gélből.....	33
3.4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> transzformáció.....	34
3.5	<i>Nicotiana benthamiana</i> növények agroinfiltrációja	34
3.6	Árpa <i>Agrobacterium</i> -közvetített transzformáció.....	35

3.7	Árpa növények fertőzése WDV-vel.....	36
3.7.1	<i>Agrobacterium</i> -közvetített WDV fertőzés.....	36
3.7.2	WDV fertőzés kabóca vektorral.....	36
3.8	RNS izolálás, northern és kis RNS northern hibridizáció.....	37
3.9	Búza (<i>Triticum aestivum</i> L.) kis RNS könyvtárak előállítása.....	38
3.9.1	A kis RNS könyvtárak bioinformatikai analízise	39
4.	EREDMÉNYEK	40
4.1	Vírusrezisztencia kialakítása árpában mesterséges miRNS technológiával.....	40
4.1.1	A felhasznált vektorok létrehozása	40
4.1.1.1	A miRNS expressziós vektor előállítása.....	40
4.1.1.2	A <i>hvu-MIR171MOD</i> vektor előállítása.....	41
4.1.1.3	Az amiRNS-ek célszekvenciáinak kiválasztása	41
4.1.1.4	Az amiRNS prekursorok létrehozása	42
4.1.1.5	GFP-szenzor konstrukciók.....	43
4.1.1.6	Policisztronikus amiRNS expressziós vektorok	43
4.1.1.7	<i>Agrobacterium</i> -közvetített WDV fertőző konstrukció	44
4.1.1.8	WDV replikáz fehérjét expresszáló konstrukció	44
4.1.2	Árpa miRNS prekursorok tesztelése tranzien rendszerben.....	44
4.1.3	A <i>hvu-MIR171MOD</i> prekursor tesztelése	45
4.1.4	A mesterséges miRNS-ek (amiRNS) létrehozása.....	46
4.1.5	WDV fertőzött árpa növények előállítása.....	50
4.1.6	Árpa transzformáció policisztronikus amiRNS konstrukcióval.....	51
4.2	Új búza miRNS azonosítása amiRNS-ként történő felhasználásra.....	54
4.2.1	Búza kis RNS könyvtárak készítése	54
4.2.2	Kis RNS könyvtárak validálása northern hibridizációval.....	55
4.2.3	A <i>tae-2187</i> -es miRNS és prekursorai azonosítása.....	58
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	60
5.1	WDV rezisztencia mesterséges miRNS alkalmazásával.....	60
5.1.1	Árpa <i>hvu-miR171</i> , mint mesterséges miRNS prekursor	60
5.1.2	Az amiRNS-ek által nyújtott rezisztencia korlátai.....	61
5.2	Búza kis RNS könyvtárak előállítása.....	61
5.2.1	Búza kis RNS könyvtárak minőségi jellemzése	62
5.2.2	Új búza miRNS prekursor amiRNS expresszálatásra.....	63
6.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	65
7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	66
8.	MELLÉKLETEK.....	74
9.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	81

Jelölések, rövidítések jegyzéke:

- 2,4-D – 2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav (szintetikus auxin)
- AgMV – *Agropyron mosaic virus* (agropyron mozaik vírus)
- AGO – 'argonaute' (argonauta fehérje)
- amiRNS – 'artificial micro RNA' (mesterséges mikro RNS)
- BaMMV – *Barley mild mosaic virus* (árpa enyhe mozaik vírus)
- BaYMV – *Barley yellow mosaic virus* (árpa sárga mozaik vírus)
- BMV – *Brome mosaic virus* (rozsok mozaik vírus)
- BrSMV – *Bromus stripe mosaic virus* (rozsok csíkos mozaik vírus)
- BSMV – *Barley stripe mosaic virus* (árpa csíkos mozaik vírus)
- BYDV – *Barley yellow dwarf virus* (árpa sárga törpülés vírus)
- cDNS – kópia DNS
- CP – 'coat protein' (köpenyfehérje)
- CYDV – *Cereal yellow dwarf virus* (gabona sárga törpülés vírus)
- DAS-ELISA – Double Antibody Sandwich-Enzyme-linked immunosorbent assay
(Duplaellenanyag szendvics-enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat)
- DCL1 – 'Dicer-like 1' (RNáz III típusú endonukleáz)
- DPI – 'Day Post Inoculation' (fertőzéstől eltelt napok száma)
- dsDNS – 'double stranded DNA' (duplaszálú DNS)
- dsRNS – 'double stranded RNA' (duplaszálú RNS)
- GFP – 'Green Fluorescent Protein' (zöld fluoreszkáló fehérje)
- GMO – Génmódosított organizmus
- hpRNS – 'hairpin RNA' (hajtú RNS)
- hptII – *hygromycin* szelekciós markergén
- IR – 'inverted repeat' (fordítva ismétlődő szekvencia motívum)
- LB – 'left border' (baloldali határszekvencia)
- LIR – 'long intergenic region' (hosszú intergénikus régió)
- LNA – 'Locked Nucleic Acid' (módosított DNS molekula)
- M – 'Mock' kontroll növény
- M – molekula súly marker
- miRNS – mikro RNS
- miRNS* – miRNS csillag szál (a miRNS komplementer szála)
- MP – 'movement protein' (mozgási fehérje)

mRNS – messenger RNS
 MSV – *Maize streak virus* (kukorica csíkosság vírus)
 NB-LRR gén – 'nucleotide-binding site leucine-rich repeat' (leucinban gazdag nukleinsav kötő doménnel rendelkező rezisztencia gének)
 NOS – nopalin szintáz
 nt – nukleotid
 ODV – *Oat dwarf virus* (zab törpülés vírus)
 OFF-target –nem kívánt célszekvencia
 phasiRNS – 'phased siRNA'
 PNK – polinukleotid kináz enzim
 Pol II – RNS-polimeráz II enzim
 pre-miRNS – prekursor miRNS
 pri-miRNS – primer miRNS
 PTGS – 'Post-Transcriptional Gene Silencing' (poszt-transzkripcionális géncsendesítés)
 RB – 'right border' (jobboldali határszekvencia)
 RCR – 'rolling circle replication' (gördülő körös replikáció)
 RDR – 'recombination dependent replication' (rekombináció-függő replikáció)
 RdRp – 'RNA-dependent RNA polymerase' (RNS-függő RNS polimeráz)
 Rep – replikáz
 RISC – 'RNA-induced silencing complex' (RNS-indukálta géncsendesítési komplex)
 RNS – ribonukleinsav
 rpm – 'rotation per minute' (fordulat/perc)
 rRNS – riboszómális RNS
 SIR – 'small intergenic region' (rövid intergénikus régió)
 siRNS – 'small interfering RNA' (kis interferáló RNS)
 sRNS – 'small RNA' (kis RNS)
 ssDNS – 'single stranded DNA' (egyszálú DNS)
 tasiRNS – 'trans-acting siRNA'
 TGS – 'Transcriptional Gene Silencing' (transzkripcionális géncsendesítés)
 Ti-plazmid – Tumor indukáló plazmid
vir – virulencia gén
 WDIV – *Wheat dwarf india virus* (búza törpülés india vírus)
 WDV – *Wheat dwarf virus* (búza törpülés vírus)
 WSMV – *Wheat streak mosaic virus* (búza csíkos mozaik vírus)

1. BEVEZETÉS

A szántóföldi növénytermesztés számára napjainkban is kihívást jelent a különböző növényi vírusok elleni küzdelem. Az ellenük való védekezés főként a vírusvektorok irtására korlátozódik, mert a növénynemesítők számára nem minden esetben állnak rendelkezésre megfelelő hatékonyságú rezisztencia gének részben a beszűkülő genetikai források, részben a vírusok gyors genetikai adaptációs képessége miatt. Mind az árpa (*Hordeum vulgare* L.), mind a búza (*Triticum aestivum* L.) sárgulást és törpülést okozó vírusbetegségeinek fő kórokozója a búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus* - WDV), ami akár 80%-os termés kiesést is okozhat számára kedvező feltételek esetén (Lindblad és Waern, 2002). Több évre kiterjedő magyarországi szántóföldi vizsgálatok bizonyítják, hogy mindkét gabona faj esetében a sárgulós tüneteket mutató, vírusfertőzött növények 88-100%-ában jelen volt a WDV (Pribék et al., 2006).

A globális klímaváltozás hatására megnövekedett biotikus stressz az egyik legnagyobb kihívást jelenti a növénytermesztésben világszerte, mivel a magasabb hőmérséklet és az elhúzódnó őszi és tavaszi klímaviszonyok kedvezően hatnak a vírusbetegségek kialakulására (Chakraborty et al., 2000; Roos et al., 2011; Trebicki et al., 2015). Ez a jelenség különösen igaz a rovarok által közvetített vírusbetegségek esetében, ahol a felmelegedés következtében a rovarvektorok migrációs potenciálja is megnövekedett (Canto et al., 2009). A WDV terjesztője a csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dhalbom; Hemiptera, Cicadellidea), mely cirkulatív, perzisztens módon terjeszti a kórokozót (Lindsten és Vacke, 1991). A rovar tojás formájában telel át, amik áprilisban kelnek ki. Az első kifejlett állatok (imágók) a hőmérséklettől függően május-június tájékán jelennek meg, majd egész évben két-három generációt hoznak létre a mérsékelt égövön (Manurung et al., 2005). A tavasz folyamán az első generációs kabócák száma akkor kezd el növekedni, mikor a napi közép-hőmérséklet tartósan eléri a 15 °C-t (Lindblad és Sigvald, 2004). A kabócák száma pozitív korrelációt mutat a WDV fertőzés mértékével, ezért a fertőzés kialakulásának szempontjából legkritikusabb a késő őszi periódus, amikor a kabóca populáció eléri a legmagasabb létszámot, ugyanakkor az őszi vetésű gabonák korai fejlődési stádiumban vannak (Praslicka, 1997). Ezért az integrált növényvédelmi gyakorlat egyre inkább előtérbe helyeződik. A helyes vetésidő megválasztással és a megfelelő idejű inszekticidus állománypermetezéssel részben visszaszoríthatjuk a vírusos megbetegedések esélyét, bár hozzá kell tennünk, hogy a vektorok száma és

mobilitása miatt az utóbbi védekezési mód nem elég hatékony. Így a növénytermesztés számára kiutat jelentenének a vírusrezisztens gabonafajták, de ez idáig csak kevés WDV toleráns gabonavonatról adott hírt az irodalom (Benkovics et al., 2010; Ordon et al., 2009).

Az RNS interferencia felfedezésével új fejezet nyílt a növényi vírusrezisztencia kialakítás történetében. Míg korábban a különböző, hosszadalmas genetikai térképezéssel azonosított, sokszor nem is ismert funkciójú rezisztenciagének átkeresztelésével nyílt csak lehetőségünk vírusokkal szemben való közvetlen védekezésre, mára az RNS csendesítés gyorsabb, hatékonyabb és szélesebb spektrumú vírusrezisztencia kialakítását teszi lehetővé. Az elmúlt évtizedben e poszt-transzkripcionális, RNS alapú gátlási mód felhasználásával számos növény faj (rizs, búza, szója, kukorica, bab, dohány, sárgadinnye, manióka, narancs, etc.), számos vírusára alakítottak már ki hatékony rezisztenciát (Cillo és Palukaitis, 2014). A különbözőképpen létrehozott RNS csendesítési módszerek közül – hatékonyságát és megbízhatóságát tekintve – a mesterséges miRNS technológia a legkiemelkedőbb (Tiwari et al., 2014). A módszer alapját képező, a növény genomjából izolált ún. miRNS prekursorok szerkezete nagyban meghatározza a belőlük kialakuló miRNS-ek mennyiségét, ezért az új miRNS prekursorok keresése ebben a témakörben is nagy jelentőséggel bír.

Mindezek alapján célkitűzéseim az alábbiak voltak:

- I. RNS interferenciára alapozott búza törpülés vírus (WDV) rezisztenciát kialakítani árpa növényben mesterséges miRNS technológiával,
 - Ennek elérése érdekében magas miRNS expressziót biztosító árpa miRNS prekursor keresése és átalakítása WDV specifikus mesterséges miRNS-t tartalmazó prekursorokká,
 - Egy gyors, tranzien rendszer kidolgozása a mesterséges miRNS-ek biológiai aktivitásának vizsgálatára,
 - A hatékonyak ítélt mesterséges miRNS-ekből előállított, policisztronikus mesterséges miRNS konstrukcióval az árpa növény genetikai transzformációja,
 - Megbízható WDV fertőzési rendszer kialakítása a létrehozott árpa vonalak tesztelésére,
- II. Búza kis RNS könyvtár adatokból olyan miRNS prekursorok azonosítása, amelyek alkalmasak lehetnek mesterséges miRNS létrehozására

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az árpa eredete és termesztésének jelentősége

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) az egyik legrégebben és legszéleskörűbben termesztett gabonanövényünk. A *Poaceae* család *Triticeae* törzsének tagja, amely megközelítően 13 millió évvel ezelőtt vált külön a törzs többi tagjától (Gaut, 2002). A vad őseből (*Hordeum spontaneum*) kisselektált változatát a Termékeny félholdban már 10500 évvel ezelőtt termesztették (Nevo, 2013; Zohary et al., 2012). Diploid ($2n=2x=14$), öntermékenyülő növény, genommérete megközelítően 5,1 gigabázis, amely eddigi ismeretek szerint kb. 30400 gént kódol (Consortium, 2012). Különböző alfajai ismertek, amiket főként a kalász morfológiájuk alapján lehet elkülöníteni egymástól. Ezek közül a legjelentősebb a többsoros, őszi árpa (*Hordeum vulgare* convar. *hexastichon*) és a kétsoros, tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* convar. *distichon*). A két változat beltartalmukat tekintve is elkülönül egymástól. Az őszi árpának a takarmányozásban (51%), a tavaszi árpának – alacsony fehérje tartalma miatt (< 11,5%) – főként a sörgyártásban (44%) van szerepe, de szalmája kiváló takarmány a kérődző állatok számára (Jolánkai, 2005). Az árpának számos előnye van az emberi táplálkozásban (pl. árpagyöngy, szirup). Magas a rost és antioxidáns tartalma, koleszterin-mentes és alacsony a zsírtartalma (Dahleen és Manoharan, 2007). FAO adatok szerint 2014-ben a világ árpatermesztése elérte a 144,5 millió tonnát, Európa ebből 93,7 millió tonnát, Magyarország pedig 1,3 millió tonnát tudhat magáénak. A világ árpa termőterülete 49,5 millió ha, ennek több mint a fele Európához tartozik. Magyarországon 2014-ben 288 ezer hektáron termesztettek árpát (fao.org/faostat).

2.2 Az árpát megbetegítő vírusok

Európában az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb figyelmet érdemelnek a növényvírusok, mert a megváltozott klímaviszonyok kedvezően hatnak a vírusbetegségek kialakulására. Az árpát több mint 50 különböző vírus fertőzheti. Bár ezek közül kevés vírus okoz gazdaságilag jelentős károkat. E vírusok között megtalálhatók mind rovarvektor által terjesztett, mind talaj mikrobák (*Polymyxa graminis*) közvetítésével fertőző kórokozók (Ordon et al., 2009; Ordon és Perovic, 2013).

A talajban előforduló vírusok közül világviszonylatban legjelentősebbek a *Potyviridae* család *Bymovirus* nemzetségébe tartozó árpa sárga mozaik vírus (*Barley yellow mosaic virus* – BaYMV) és az árpa enyhe mozaik vírus (*Barley mild mosaic virus* – BaMMV). A rovarvektorok által terjesztett vírusok közül pedig az árpa sárga törpülés vírus (*Barley yellow dwarf virus* – BYDV; *Luteovirus*) és a gabona sárga törpülés vírus (*Cereal yellow dwarf virus* – CYDV; *Polerovirus*) különböző változatai a legelterjedtebbek. Mindkét vírust levéltetvek közvetítik. A különböző levéltetű vektorokra specializálódott BYDV és CYDV törzseket külön fajokba sorolják (BYDV-PAV, BYDV-PAS, BYDV-MAV, BYDV-GPV, BYDV-RMV, BYDV-SGV; CYDV-RPS, CYDV-RPV) (Ordon és Perovic, 2013). Említést érdemel még a maggal és mechanikai úton is terjedő árpa csíkos mozaik vírus (*Barley stripe mosaic virus* – BSMV; *Hordevirus*) és a rozsok mozaik vírus (*Brome mosaic virus* – BMV; *Bromovirus*), illetve kisebb jelentőséggel a búza csíkos mozaik vírus (*Wheat streak mosaic virus* – WSMV; *Tritimovirus*) és a tarackbúza mozaik vírus (*Agropyron mosaic virus* – AgMV, *Rymovirus*) (Szunics et al., 2000).

Az itt felsorolt vírusok mindegyike RNS genommal rendelkezik. Az árpát fertőző vírusok egyetlen DNS genommal rendelkező tagja a *Geminiviridae* család *Mastrevirus* nemzetségébe tartozó búza törpülés vírus (*Wheat dwarf virus* – WDV), amely az árpa legelterjedtebb és legdrasztikusabb tüneteket okozó virális kórokozója.

2.3 A *Geminiviridae* család

Geminiviridae család kilenc nemzetséget foglal magába: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Grablovirus*, *Eragrovirus*, *Mastrevirus*, *Topocovirus* és *Turncurtovirus* (Zerbini et al., 2017). A család minden tagjának virionja egy vagy két komponensből álló, cirkuláris, egy szálú DNS (ssDNS) genomot tartalmaz, melynek mérete ~2,6–3,0 kilobázis. Egy viriont két (iker) ikozahedrális kapszid burok alkot, amely egy ssDNS genomot tartalmaz. A virion mérete ~18x30 nanométer. A gazdasejtbe jutó genomok komplementer szála a sejtmagban szintetizálódik meg. Ez a kétszálú DNS (dsDNS) genom biztosítja a vírus szaporodásához, mozgásához és becsomagolódásához szükséges fehérjék expresszióját. (Stanley et al., 2005). A dsDNS genomokat megkötik a növényi hiszton molekulák, melynek következtében a vírus mintegy mini kromoszómaként képes működni a növény sejtmagjában (Pilartz és Jeske, 1992). A geminivírusok 4-7 fehérjét kódolnak, amelyek egy vagy két genomon helyezkednek el. A kicsi, komplex genom megköveteli a lehető legjobb „helykihasználást”, ezért a geminivírusoknál elterjedt a kétirányú RNS átírás is.

(Gutierrez et al., 2004). Úgynevezett gördülőkörös replikáción (RCR – rolling circle replication) keresztül replikálódnak, de a különböző vírustörzsek rekombináción alapuló mechanizmuson keresztül (RDR – recombination dependent replication) is képesek növelni genetikai változatosságukat (Jeske et al., 2001).

2.3.1 A búza törpülés vírus (WDV) jellemzése

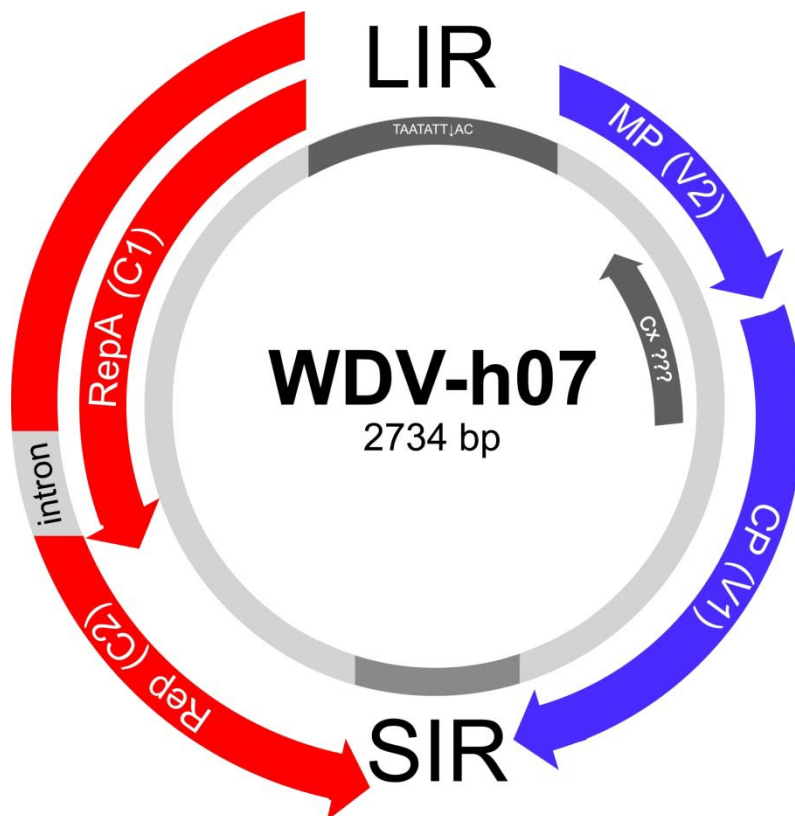
A *Mastrevirus* nemzetség fajai – melyek közé a WDV is tartozik – egyetlen, ssDNS genommal rendelkeznek. Terjesztőik különböző kabóca fajok. A mastrevírusok gazdanövényköre főként egyszikű növényekre korlátozódik, de megtalálhatóak köztük kétszikűekre specializálódott fajok is. A *Geminiviridae* család legősibb nemzetségének tekintik (Nawaz-ul-Rehman és Fauquet, 2009). Genomjuk ~2750 nukleotid nagyságú, mely négy átíródo leolvasási keretet tartalmaz, melyek a köpenyfehérjét (CP – coat protein; V1), a mozgási fehérjét (MP – movement protein; V2) és a két replikációban résztvevő fehérjét (RepA, C1; Rep, C2) kódolják (1. ábra). A CP és az MP fehérjék a virionban található ssDNS szálon vannak kódolva (virion-sense – V), a Rep és a RepA fehérjék pedig a komplementer szálon (complementary-sense – C) (Gutierrez et al., 2004; Kvarnheden et al., 2002).

A WDV-nek a gazdanövény specificitása szerint két fő törzse ismert: árpa és búza törzs. A két törzsről igazolták, hogy bár ugyanaz a kabóca faj a vektoruk, de az egyik törzs nem fertőzi a másik gazdanövényét. Mindkét törzsnek sok gyomnövény is gazdanövénye lehet, melyek nem feltétlen mutatnak az említett kultúrnövényeknél megfigyelt súlyos tüneteket (Tóbiás et al., 2008). A WDV búza törzsei 98%-os, az árpa törzsek pedig 94%-os szekvencia homológiát mutatnak egymással. A két törzs között pedig ~84%-os a hasonlóság nukleotid szinten (Ramsell et al., 2009). A két törzset kétszázharminc WDV izolátum filogenetikai analízise pedig további 6 csoportra (A-F) bontotta (Wu et al., 2015). Említést érdemel még a filogenetikailag különböző fajként számon tartott, de nagyon hasonló tüneteket okozó zab törpülés vírus (*Oat dwarf virus* – ODV; *Mastrevirus*) és a búza törpülés india vírus (*Wheat dwarf india virus* – WDIV; *Mastrevirus*). Az utóbbi azért figyelemre méltó, mert a mastrevírusok között eddig az egyetlen, amely rendelkezik szatellit DNS molekulával is (Kumar et al., 2015; Schubert et al., 2007).

A replikációért felelős gének igen konzerváltak. Nem csak az egyes WDV törzsekre nézve, de a *Geminiviridae* család más tagjai között is. Ellentétben a köpenyfehérje génnel, amely sokkal variábilisabb (Hanley-Bowdoin et al., 2013). A komplementer szensz szálon van egy ötödik leolvasási keret (Cx), amely egy 14,6

kilodalton nagyságú fehérjét kódol, de ennek nem ismert a funkciója és az expresszióját sem bizonyították (Bendahmane et al., 1995; Schubert et al., 2003). A WDV-hez hasonlóan a közeli rokon kukorica csíkosság vírus (*Maize streak virus* – MSV; *Mastrevirus*) esetében is kimutattak egy 9,7 kilodalton nagyságú fehérjét kódoló leolvasási keretet azonos pozícióban, aminek expressziója szintén nem igazolódott (Lazarowitz, 1986).

A hosszú intergénikus régió (LIR) biztosítja az említett gének expresszióját, a SIR régió pedig az átírás terminációjában van szerepe (Kvarnheden et al., 2002).



1. ábra: A WDV genomfelépítése. *Rep*, *RepA* (replicase-associated protein) – replikáz gének; *MP* (movement protein) – mozgási fehérje gén; *CP* (coat protein) – köpenyfehérje gén; *SIR* (small intergenic region) – rövid intergénikus régió; *LIR* (long intergenic region) – hosszú intergénikus régió; 'TAATATT↓AC' – replikációs origó konzervatív szekvenciája; Cx – feltételezett ötödik leolvasási keret

A LIR régióban található a vírus replikációs origója is, amely tartalmaz egy a geminivírusok körében konzerválódott szekvencia motívumot (5'- TAATATT↓AC - 3'), ami – az egyszálú genom másodlagos szerkezetét nézve – egy hajtű szerkezet hurokrészében helyezkedik el. A nyíllal jelölt részen a Rep fehérje endonukleáz aktivitásának köszönhetően képes elhasítani a genomot, ahonnan a gazdasejt más faktorainak közreműködésével megindítja a genom gördülőkörös amplifikációját (Gutierrez et al., 2004). Önmagában a Rep fehérje már elegendő a vírus genom

replikációjához, de emellett a RepA fehérje jelenléte még arra is készíti a sejtet, hogy az S-fázisban maradjon. Ezáltal a sejt folyamatosan a DNS-ének megkettőződésére van felkészülve, így még inkább kiszolgálja a vírust a különböző gazdafaktorokkal, amik a vírus replikációhoz is szükségesek (Hanley-Bowdoin et al., 2013). A replikáz fehérje (Rep) képes megkötni a kis RNSeket, így a sejt által előállított, WDV RNS-ekre specifikus siRNSeket (small interfering RNA – kis interferáló RNS) is, melyek kulcsmolekulái a növényi sejt vírusokkal szembeni RNS interferencia alapú védekezésének (Liu et al., 2014). A CP fehérjének a vírus becsomagolása mellett szerepe van a rovarátvitelben és a szisztémikus fertőzés kialakulásában (Dickinson et al., 1996; Liu et al., 2001b). Az MP fehérje a plazmodezmákon keresztül, sejtről-sejtre történő vírus átjutásért felelős (Liu et al., 2001a).

2.3.2 A WDV vektora, a csíkos gabonakabóca

A WDV-t kizárólag a *Psammotettix alienus* Dhalbom (*Hemiptera* rend, *Cicadellidae* család) kabócafaj terjeszti cirkulatív, perzisztens módon. E vírusátviteli mód lényege, hogy a vírus a fertőzött növényi nedvvel együtt a rovar bélesatornájába kerül, ahonnan a hemolimfán (nyirok rendszer) keresztül átjut a rovar járulékos nyálmirigyébe, ugyanakkor szaporodásra a rovar szervezetében nem képes (Horváth et al., 1999).

A rovar tojás formájában telel át, amik áprilisban kelnek ki. A hőmérséklettől függően az első imágók május-június tájkán jelennek meg, majd egész évben két-három generációt hoznak létre a mérsékelt égövön (Manurung et al., 2005). A WDV-t a kabócák a nyár folyamán veszik fel a fertőzött árvakelésekről, vagy a gabonatóblát szegélyező füves területekről. A rovar eddigi ismeretek szerint a vírusos növényen történő táplálkozás után 5 perccel már fertőzőképesé válik (Whitfield et al., 2015).

A kabócák a növény epidermiszén és a mezofillumon áthatolva a floémből nyerik táplálékukat. A behatoláskor gélesedő anyagot választanak ki, mellyel szétfeszítik a sejteket és kialakítanak a levéllemezen egy tartós képletet, az úgynevezett nyálhüvelyt. Ezáltal a rovar szinte a sejtek roncsolása nélkül képes a floémből történő táplálkozásra így csökkentve a növényi stressz válaszokat. A floémet elérve a táplálkozás megkezdése előtt egy hígabb konzisztenciájú, vízszerű nyálat választ ki, amivel a táplálkozását segíti (Tholt, 2011). A vírust hordozó állat ennek következtében nem csak az általa kiválasztott nyálat juttatja a növényi

szövetekbe, hanem magát a korábban felvett viriont is. A perzisztens vírusátvitel jellemzője, hogy bizonyos időnek el kell telnie a vírus felvétele és leadása között, tekintettel arra, hogy a vírusnak át kell jutnia a bélcsatornából a járulékos nyálmirigybe. Ezen inkubációs idő elteltével a vektorok a fertőzőképességüket akár életük végéig is megőrizhetik (Horváth et al., 1999). Mivel a különböző transzport folyamatok a rovaron belül aktív formában zajlanak le – ami egy speciális, bonyolult kapcsolatot feltételez –, a perzisztens vírusok általában egy vagy kevés vektorral rendelkeznek.

2.3.3 A WDV elterjedése és az általa okozott tünetek

A WDV-t először 1961-ben izolálták az akkori Csehszlovákiában (Vacke, 1961), Magyarországon először 1988-ban írták le a kórokozót (Gáborjányi et al., 1988).

A *Mastrevirus* nemzetség tagjai, köztük a WDV is széles körben elterjedtek a világon, előfordulnak Európában, Afrikában, Ázsiában és Ausztráliában is (Kvarnheden et al., 2002).

A vírussal fertőzött növény levele jellegzetes sárgulós tüneteket mutat, a levelek csavarodnak, korai fertőzés esetén a növény törpe marad, az internódiumok rövidülnek. A növények nem, vagy csak nagyon nehezen kalásznak. A WDV által okozott tünet együttes nagyon hasonló a BYDV fertőzésre jellemző tünetekhez (Gáborjányi, 1990). Búzán megfigyelték, hogy a tavaszi időszakban, a szárba indulás időszakától – az első nódusz megjelenésétől – kezdve már sokkal kisebb eséllyel fertőződik meg a vírussal a növény (rezisztens fejlődési fázis) (Lindblad és Sigvald, 2004).

Magyarországon egy négy éves szántóföldi vizsgálat során megállapították, hogy a sárgulást okozó virális kórokozók között (BYDV, CYDV, WDV) a WDV a legszármottevőbb (Pribék et al., 2006). A 2001-től 2005-ig tartó időszak alatt a búza, árpa, durum búza, zab és tritikálé vetésekről gyűjtött tünetes mintákban a WDV-t mutatták ki a legnagyobb arányban (88-100%). Árpánál majd mind a 4 évben a minták 100%-ában jelen volt a WDV. A vizsgálatok egyébként sok esetben kevert fertőzést mutattak ki. Hozzá kell tenni, hogy a kísérleti módszerből adódóan az eredményekből csak az említett gabonavírusok arányaira kaphatunk információkat, a tényleges szántóföldi elterjedésükre ez a kísérlet nem ad választ, mert a mintavétel csakis a sárgult, törpe növényekre korlátozódott.

Papp et al. (2017) szerint, akik 16 év szántóföldi adatait dolgozzák fel a dél-magyarországi régióban, a WDV bizonyult a legelterjedtebb gabonavírusnak. A

kísérlet során DAS-ELISA szerológiai eljárást alkalmazva öt vírus (WDV, BYDV, WSMV, BSMV, BMV, BrSMV – rozsnok csíkos mozaik vírus) jelenlétét vizsgálták és a 16 év átlagában a WDV aránya 35% volt a pozitív levélminták tekintetében. A WDV-t követte a BYDV 21%-kal, a BSMV 14%-kal, a BMV és a WSMV 13-13%-kal és végül a BrSMV 4%-kal.

Svédországban évtizedek óta nagy károkat okoz a WDV, ezért ott a vele kapcsolatos kutatások is nagyobb hangsúlyt kapnak. Közép-Svédországban, a múlt század elején adtak hírt először WDV fertőzéshez köthető kár eseményekről búzavetésekből. Azóta periodikusan újra és újra megjelennek ezek, a ma már azonosíthatóan WDV okozta tünetegyüttesek, jelentős károkat hagyva maguk után a gabonatermesztésben. Ma pedig már azt is tudják, hogy ez a periodicitás szoros korrelációt mutat az agronómiai gyakorlattal (Roos et al., 2011).

2.3.4 WDV okozta gazdasági károk és az ellene történő védekezés

A WDV-vel szembeni védekezés egyik leghatékonyabb módszere a rezisztens fajták termesztése lenne, azonban a növénynemesítés csupán mérsékelten toleráns genotípusokkal rendelkezik a kórokozóval szemben (Benkovics et al., 2010; Ordon et al., 2009). Nygren et al. (2015) a három különböző növény genomját tartalmazó kenyérbúza (*Triticum aestivum* L.) esetében bebizonyították, hogy a domesztikáció nincs hatással a WDV toleranciára, mivel a búza vad ősei is hasonló fogékonyságot mutattak a kórokozóra. Ezek ismeretében a hagyományos növénynemesítés számára még nehezebb az a feladat, hogy új, rezisztens genotípusokat találjon. Így az ellene történő védekezés a rovarvektorok irtására, illetve a megfelelő agrotechnikára korlátozódik, amelynek fontos része a vetésidő megválasztása.

Lindblad és Waern (2002) szerint a nagymértékű WDV fertőzés kialakulásának egyik legmeghatározóbb tényezője a vetésidő és az adott hőmérsékleti viszonyok. A korai vetés, amely az áttelelés szempontjából akár előnyt is jelenthet, a WDV fertőzés kialakulását nagyban segíti. A kora őszi periódus nyújtotta környezeti viszonyok kiválóak a vektorok migrációja és táplálkozása szempontjából, amik a primer fertőzések esélyét és gyakoriságát nagyban növelik. Értelemszerűen, korai vetés esetén a növény kelésétől a tél beálltáig, majd a termés megjelenéséig hosszabb idő telik el, ami a kabócavektorok szaporodását és elterjedését is elősegíti, ez a következő évben a nimfák számának növekedésében nyilvánul meg, növelve ezzel a másodlagos WDV fertőzés gyakoriságát. Svédországi

vizsgálatoknál az augusztus közepi vetések esetében a különböző területek között volt, ahol a termésveszteség elérte a 80%-ot is. Ugyanakkor a vetésidő növekedésével egyenes arányban csökkent a WDV fertőzöttség, amely a szeptember 5-ei vetésidőtől csupán 18%-ban maximalizálódott a vizsgált területeken.

Természetesen a vetésidő megválasztásának egyik legsarkalatosabb pontja a napi középhőmérséklet alakulása. Alacsony napi középhőmérséklet (10 °C) esetén lényegesen kevesebb kabóca volt begyűjthető a szántóföldekről. A hőmérséklet emelkedésével pedig nőtt a vektor populáció. 15 °C-nál már igen magas számban voltak jelen a kabócák (Roos et al., 2011). Búza esetében azt tapasztalták, hogy ha az elsődleges, őszi WDV fertőzéseket sikerül meggátolni, elkerülni, akkor az általa okozott gazdasági kár elég alacsony szinten tartható (Lindblad és Sigvald, 2004).

2.4 Az RNS interferencia különböző útvonalai növényekben

Az RNS interferencia jelenségét először fonálférgekben (*Caenorhabditis elegans*) írták le, bár ebben a publikációban még nem tesznek említést a jelenségért felelős kis RNS-ekről. A téma jelentőségét tükrözi, hogy a szerzők 2006-ban orvosi Nobel díjat kaptak felfedezésükért. A Nobel díjas kísérlet lényege az volt, hogy egy hiányát tekintve nem letális gént (*UNC-22*) csendesítettek le egyszálú (szensz vagy antiszensz) és duplaszálú RNS-ek (szensz és antiszensz) injektálásával. A gén csendesítése következtében az állatok jellegzetes remegést mutattak a vad típusúakhoz képest. Az eredményeik közt az is szerepelt, hogy a duplaszálú RNS-ek (dsRNS) injektálása során nagyságrendekkel nagyobb hatást tudtak elérni, mint amikor egyszálú formában injektálták a génnel homológ szekvenciájú RNS-eket (Fire et al., 1998).

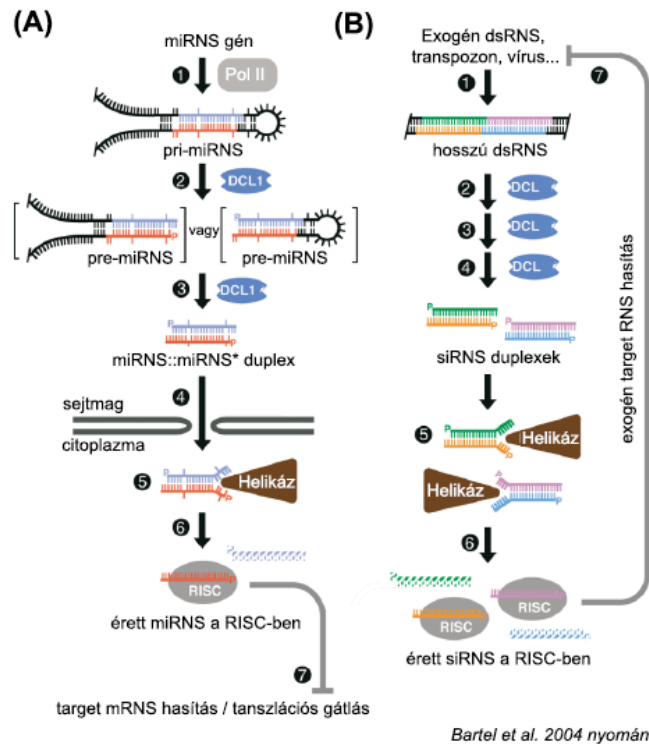
Egy évvel később megjelent az első publikáció a növényi RNS interferencia PTGS (Post-transcriptional Gene Silencing – poszt-transzkripcionális géncsendesítés) útvonaláról is, amelyben ezt a géncsendesítési mechanizmust kis RNS-ekhez kötik. A kísérletben egy konstitutívan meghajtott 1-aminociklopropán-1-karboxilát oxidáz (*ACO*) génnel transzformált paradicsom vonalakat vizsgáltak, melyek mindegyike tartalmazta a transzgén konstrukciót, azonban nem mindegyik a róla expresszált mRNS-t, az utóbbi vonalak esetében pedig northern hibridizáció segítségével ki tudtak mutatni a génnel komplementer szekvenciákat tartalmazó kis RNS-eket, amiket ők akkor 25 nukleotid nagyságúra becsültek (Hamilton és Baulcombe, 1999).

A kis RNS-ek (small RNA – sRNA) hosszuk, biogenezisük és hatásuk kifejezésének módja alapján nagyon heterogén és sokoldalú molekulák, de alapvetően két nagy csoportba sorolhatjuk őket: a kis interferáló RNS-ek, vagy siRNS-ek és a mikroRNS-ek (miRNS) csoportjába (Tiwari et al., 2014).

Az RNS interferencia (RNS csendesítés) mechanizmusait a növényi sejt alapvetően három különböző célra használja. Először is a transzkripcionális géncsökkentésen (Transcriptional Gene Silencing – TGS) keresztül különböző siRNS molekulák irányításával – a DNS hipermetilációja által – kialakítja és fenntartja a genom heterokromatikus állapotát a repetitív, és a transzpozonokat tartalmazó DNS szakaszokon. Másodszor, a poszt-transzkripcionális géncsökkentés (PTGS) által a növény fejlődésében, a különböző stressz válaszokban és más endogén szabályozási feladatokban játszik esszenciális szerepet, különböző mikro RNS-ek (miRNS) expressziójával (Bartel, 2004). Nem utolsó sorban pedig a patogénekre (vírus, baktérium, gomba) adott növényi válaszokban is kiemelkedő szerepe van. E tekintetben a kis RNS-ek közvetlenül is kifejthetik hatásukat az exogén (virális) RNS-ről keletkezett siRNS-eken keresztül, de közvetett szerepük is lehet a különböző rezisztencia gének (NB-LRR), vagy egyéb rezisztencia faktorok (auxin-receptorok) expressziójának szabályozása által (Navarro et al., 2006; Zhao et al., 2015).

A különböző módon létrejövő ~20-24 nukleotid hosszúságú kis RNS-ek mindegyikéről elmondható, hogy egy hosszabb, duplaszálú RNS (dsRNS) struktúráról keletkeznek. A siRNS-ek esetében ez egy teljes komplementaritással rendelkező duplaszálú RNS, a miRNS-ek esetében pedig egy önmagával (részben) komplementaritást mutató, úgynevezett hajtű RNS szerkezetet (primer miRNS – pri-miRNS) jelent, amelyről általában csak egy funkcióképes miRNS érik ki, ellentétben a siRNS-ekkel, ahol a hosszú – teljes komplementaritást mutató – dsRNS-ekről számos siRNS keletkezik (2. ábra). A miRNS-ek alatt minden esetben endogén RNS-ről létrejött kis RNS-eket értünk. Ellentétben a siRNS-ekkel, amik létrejöhetnek exogén (antivirális válasz - siRNS) vagy endogén duplaszálú RNS-ekről (tasiRNS – trans-acting siRNS; phasiRNS – phased siRNS) egyaránt (Bartel, 2004). Az evolúciójukat tekintve a mai napig nem tisztázott, hogy az endogén szabályozási feladatokat ellátó mechanizmusok, vagy a virális válaszokban szerepet játszó siRNS alapú útvonal alakult-e ki korábban (Hohn és Vazquez, 2011).

A továbbiakban a virális védekezésben szerepet játszó siRNS és az endogén szabályozást végző miRNS útvonalat mutatom be részletesebben.



2. ábra: Az RNS interferencia miRNS (A) és siRNS (B) útvonala. *PolII* – RNS polimeráz II; *pri-miRNS* – primer miRNS; *pre-miRNS* – prekursor miRNS; *RISC* – 'RNA-induced silencing complex' (RNS-indukálta csendesítési komplex); *DCLI* – Dicer-szerű fehérje, Rnáz III aktivitású enzim; *siRNS* – kis interferáló RNS

2.4.1 A miRNS útvonal

A növények többsége több mint 100 miRNS génnel rendelkezik, amik a genomban főként az intergénikus régiókba lokalizálódnak (Rogers és Chen, 2013). A legtöbb miRNS szekvenciája konzervált a növényvilágban rendszertanilag távol álló növények között is (mohák, nyitvatermők, egy- és kétszikűek), ugyanakkor vannak faj, vagy nagyobb rendszertani egységre specifikus miRNS-ek is. Az egyes miRNS gének több kópiában is előfordulhatnak a növény genomjában, amiket azonos miRNS családokba sorolnak (pl. *mir171a*, *miR171b*). Az ezekben kódolt miRNS-ek szekvenciája nagyobb részt megegyezik vagy 1-2 nukleotidos eltérést mutathat, de cél mRNS-eik (messenger (hírvivő) RNS) általában ugyanazok (Zhang et al., 2006). Ugyanakkor a család egyes tagjainak expressziója időben, térben vagy mennyiségben nagyban eltérhet egymástól (Vaucheret, 2009).

A növényi PTGS útvonalban résztvevő miRNS-ek többségében 21 nukleotid hosszúságúak, melyek egy érési folyamat (2. ábra/A) eredményeként alakulnak ki egy hosszabb RNS molekulából (primer miRNS – *pri-miRNS*) két lépésben. A *pri-miRNS*-ek a genomban kódolt *MIRNS génekről* íródnak át az RNS-polimeráz II

enzim (Pol II) által, melyek ugyanúgy rendelkeznek 5'- metilált guanozin sapkával és 3'-polyA farokkal, mint bármilyen genomban kódolt mRNS (Bartel, 2004). Sokáig azt hitték, hogy ezek a pri-miRNS-ek fehérjéket nem kódolnak, hiszen már a sejtmagban megkezdődik a feldolgozásuk, viszont a közelmúltban bebizonyosodott, hogy a pri-miRNS-ek is kódolhatnak kis peptideket, amik befolyásolhatják az adott miRNS expresszióját (Laouressgues et al., 2015). Az önmagával részben komplementer szekvenciákat tartalmazó pri-miRNS jellegzetes hajtű szerkezetet vesz fel, melyet a DCL1 (Dicer-like 1) RNáz III típusú endonukleáz enzim specifikusan felismer és kialakítja belőle a kisebb prekursor miRNS-t (pre-miRNS). Szintén a DCL1 enzim munkájának eredményeként a pre-miRNS-ből érik ki a miRNS duplex (miRNS::miRNS*), amely később kilép a sejt citoplazmájába (Tiwari et al., 2014).

Az egyes növényfajok konzervált miRNS prekursorai között lényeges szekvencia eltérések lehetnek, ami által a másodlagos szerkezetük is merőben más lehet. Ugyanakkor a miRNS és a miRNS* szál szekvenciájában nagyon ritkán vannak eltérések (Jones-Rhoades, 2012).

Az érés szempontjából a prekursor speciális másodlagos szerkezete nagyban hozzájárul ahhoz, hogy abból a miRNS duplex megfelelő helyről érjen ki. A duplex szálai 2 nukleotid 3' túlnyúló véggel rendelkeznek, melyeket a HEN1 enzim metilál, biztosítva ezzel a miRNS-ek stabilitását (Rogers és Chen, 2013).

A miRNS komplementer szála (miRNS*) az esetek döntő részében eliminálódik és a miRNS a citoplazmában beépül a RISC-be, pontosabban annak központi, végrehajtó fehérjemolekulájába az AGO-ba (Argonaute). A miRNS 5'-végének termodinamikai stabilitása gyengébb, mint a 3'-végen, amely egy lényeges kritériuma a miRNS szál kiválasztásának. A növényeknek több (*Arabidopsis thaliana*: 10 db) AGO fehérjékük van, melyek különböző méretű, kezdő nukleotidú és eredetű (siRNS, miRNS) kis RNS-ekre specializálódtak. A PTGS útvonalba csatlakozó 21 nukleotidos miRNS-ek főként az AGO1-be épülnek be és döntő többségükben uracillal (U) kezdődnek. A miRNS-sel töltött RISC-ek felismerik a miRNS-sel (általában csak részben) komplementer mRNS-eket és elvágják azokat. A miRNS-ek transzlációs gátlás útján is kifejthetik hatásukat. Ha valamilyen okból a komplex nem képes elvágni az adott mRNS-t, azon rajta maradva gátolhatja a róla történő transzlációt a riboszómában. Ilyen ok lehet például, ha a miRNS a 10-11. pozíciójában nem komplementer a cél mRNS-sel – mivel az AGO ennél a pozíciónál végzi a vágást – ez által hasítás hiányában a komplex rajta marad az adott mRNS-en és gátolja a transzláció tovább jutását (Rogers és Chen, 2013).

2.4.2 A siRNS útvonal

A vírusokkal szembeni RNS interferencián alapuló védekezés (2. ábra/B) kulcsmolekulái, a ~21-24 nt hosszúságú siRNS-ek. A vírusfertőzés során a növény citoplazmájába került RNS-eknek létrejön a komplementer szála kialakítva ezzel egy hosszú, duplaszálú RNS (dsRNS) molekulát. A komplementer szál létrejöhet a vírus szaporodásának következtében, vagy a növényi RNS-függő RNS polimerázok (RdRp) munkája által. Mindezek mellett a virális RNS rendelkezhet önmagával komplementer szekvencia motívumokkal, ezáltal kialakulhatnak kisebb hajtú szerkezetek, amelyek szintén indukálhatják az RNS interferencia siRNS útvonalát. A DNS vírusok genomjáról átíródó RNS-eknek a növényi RdRp-k szintén meg tudják szintetizálni azok komplementer szálát, és az így kialakult dsRNS-ek képesek becsatornázódni a siRNS útvonalba. A hosszú dsRNS-eket a Dicer enzimek (DCL4, DCL2, DCL3) felismerik és 21, 22 vagy 24 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre darabolják őket. A többségében 21 nukleotidos siRNS-ek pedig beépülnek az AGO fehérjékbe (AGO1, 2, 5), majd az összeszerelődött RISC-ben iniciálják a velük komplementer (virális) RNS-ek degradációját (Wang et al., 2012).

A keletkező siRNS-ek nem csak az adott sejtben nyújtanak védelmet, hanem beindítanak egy mobil szignál rendszert, amely elindítja a fertőzéstől távolabbi sejtekben is az RNS interferenciát (Voinnet és Baulcombe, 1997).

A siRNS alapú virális védekezést az egyes vírusok számos ponton gátolhatják. A különböző virális fehérjék az idők során úgy evolválódtak, hogy nem csak a szaporodásért, vagy terjedésért felelős funkciókat látják el, hanem képesek például megkötni a hosszú duplaszálú RNS-eket, vagy az azokról létrejött siRNS duplexeket. Más vírusok pedig a siRNS-ek biogenezisét végző fehérjékkel (DCL, AGO) kapcsolatba lépve gátolják azok kialakulását (Csorba et al., 2015). Az ilyen virális fehérjéket RNS interferencia szupresszoroknak nevezzük.

2.4.3 Az RNS interferencia hőmérsékletfüggősége

A növény-vírus kapcsolatokat erősen befolyásolják a környezeti tényezők. Már az RNS interferencia felfedezése előtt is beszámoltak olyan vírus-növény kapcsolatokról, ahol a hőmérséklet emelkedésével megjelentek úgynevezett kigyógyuló fenotípusok (Gáborjányi, 1990). Szittyá et al. (2003) *Nicotiana benthamiana* növényen bizonyították, hogy ez a jelenség az RNS interferencia siRNS útvonalának alacsony hőmérsékleten (<15 °C) történő hiányával, majd magasabb

hőmérsékleten történő újra aktivizálódásával hozható összefüggésbe. Kísérletükben különböző hőmérsékleten (15, 21, 27 °C) tartott *Cymbidium ringspot virus*-sal (CMV) fertőzött dohány növényekből northern hibridizációval detektálták a vírus genomról létrejövő siRNS-eket. A hőmérséklet csökkenésével egyenes arányosan csökkent a siRNS-ek mennyisége, amely 15 °C-on már a kimutatási határ alatt volt. Ellentétben az endogén szabályozási feladatokat ellátó miRNS-ekkel, melyek minden hőmérsékleten azonos mennyiségben voltak jelen a vizsgált növényekben, ami nem meglepő, tekintve, hogy a miRNS-ek számos növényfejlődés biológiai folyamatban meghatározó szerepet játszanak. Az már elgondolkoztatóbb, hogy vajon miért jelent előnyt, ha a virális védekezésben fontos siRNS útvonal alacsony hőmérsékleten gátolva van? A szerzők arra következtetnek, hogy ennek fejlődésbiológiai okai lehetnek. Mégpedig az, hogy a PTGS siRNS alapú útvonalát kiszolgáló enzimek részt vehetnek a siRNS alapú metilációs folyamatokban (TGS) is, amelyek fontos fejlődésbiológiai eseményeket irányíthatnak (pl. vernalizáció).

2.5 Az RNS interferencia felhasználása célzott géinaktivációra

Az RNS interferencia poszt-transzkripcionális gátláson alapuló mechanizmusait képesek vagyunk kihasználni a célzott géncsendesítési eljárások során. Itt nem csak növényi géneket említhetünk meg, lehet szó víusról, viroidról de akár rovar vagy gomba gének csendesítéséről is (Baum et al., 2007; Nowara et al., 2010). Mindehhez a növényi sejtben olyan duplaszálú RNS struktúrákat kell tudnunk termeltetni, melyek be tudnak csatornázódni az RNS interferencia valamely PTGS útvonalába, majd az azokról létrejövő 21 nukleotidos kis RNS-ek képesek a megfelelő AGO fehérjébe beépülni és kifejteni hatásukat a célzott mRNS-re.

2.5.1 Antiszensz-gén technológia

Korábban azt gondolták, hogy az antiszensz technológia lényegét az adja, hogy a teljesen vagy részben komplementer szensz és antiszensz RNS-ek a hibridizációjuk következtében nem képesek a riboszómához kapcsolódni és az általuk hordozott fehérje kódját manifesztálni. Mindemellett azt is megfigyelték, hogy ezek a duplaszálú RNS-ek gyorsan degradálódnak. A technológia segítségével létrehoztak vírusrezisztens, vagy anyagcseréjében módosított növényt is egyaránt (Van Der Krol et al., 1988). Később azonban az RNS interferencia mechanizmusának megismerésével világossá vált, hogy ez a technológia is inkább alapszik a kis RNS-

ek általi RNS degradáción, mint a dsRNS nyújtotta mRNS inaktiváción. Azt is megfigyelték, hogy a duplaszálú RNS struktúra direkt bejuttatása sokkal hatékonyabb RNS csendesítést tesz lehetővé, mintha (antiszensz) egyszálúként juttatnák be azt (Fire et al., 1998).

2.5.2 Inverted repeat (IR) technológia

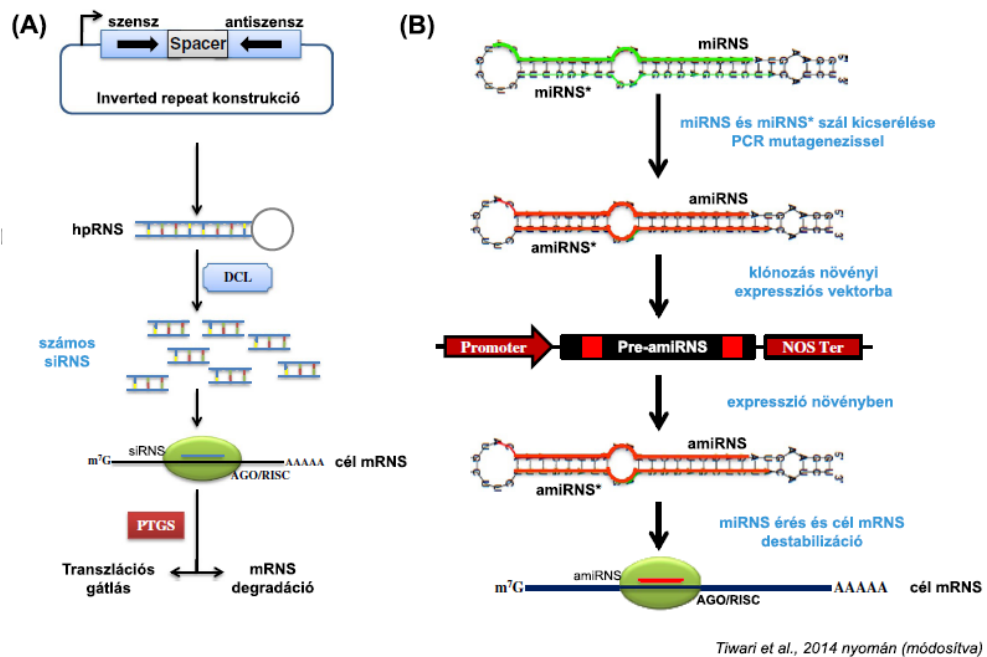
Az inverted repeat vagy más néven hpRNS (hairpin (hajtű) RNS) technológia (3. ábra/A) lényege, hogy a konstrukció a csendesíteni kívánt gén egy darabját szensz és antiszensz formában is tartalmazza. Ennek következtében a transzgénről átíródó RNS a szekvencia komplementaritás miatt önmagával képes hibridizálódni és ezzel hosszú dsRNS molekulát létrehozni, amely közvetlenül képes becsatornázódni az RNS interferencia siRNS útvonalába. A konstrukció általában ~300-800 nukleotid nagyságú darabot tartalmaz a csendesíteni kívánt gén kódoló régiójából szensz és antiszensz formában, melyeket többször egy kivágódó intron, vagy egy távtartó, úgynevezett „spacer” szekvencia választ el (Wang és Waterhouse, 2002).

2.5.3 Mesterséges miRNS (amiRNS) technológia

A mesterséges miRNS ('artificial' mikro RNS – amiRNS) technológia az előzőekhez képest elég szofisztikáltnak tűnhet, de számos előnye miatt megéri a fáradozást, hogy ezzel a módszerrel hajtsunk végre specifikus géncsökkentést.

Az amiRNS-ek hasonlóan a miRNS-ekhez egyszálú, ~21 nukleotid hosszúságú RNS molekulák. Úgy hozhatunk létre ilyen molekulákat, ha behelyettesítjük a kívánt 21 nukleotidos amiRNS szekvenciát egy ismert prekursor miRNS-ének a helyére, majd ezt követően a miRNS-sel komplementer (miRNS*) szálat is úgy módosítjuk, hogy a prekursor speciális másodlagos szerkezete ne változzon (3. ábra/B), amely fontos tényezője a miRNS-ek biogenezisének (Tiwari et al., 2014). A tervezés további kritériumai (Schwab et al., 2006) a következők:

- Az amiRNS megfelelő végrehajtó komplexbe (AGO1) történő beépüléséhez szükséges az 5'-U kezdő nukleotid.
- Az amiRNS 3'-végén G vagy C nukleotidok legyenek. Itt erősebb bázispárosodás kell, hogy létrejöhessen a csillag szállal.
- A cél RNS-sel az 5'- 2. és 12. pozícióban fontos a bázispárosodás.
- A cél RNS-sel az 5'- 10. és 11. pozícióban is fontos a bázispárosodás (AGO1 itt hasít).



3. ábra: Az inverted repeat (A) és a mesterséges miRNS (B) technológia folyamatábrája; *hpRNS* – hairpin (hajtű) RNS; *DCL* – Dicer enzim; *siRNS* – kis interferáló RNS; *RISC* – RNS indukálta géncsendesítési komplex; *amiRNS* – mesterséges miRNS;

Az amiRNS technológia számos előnyt hordoz az inverted repeat (*hpRNS*), vagy az antiszensz gén technológiákkal szemben. Első és legfontosabb, hogy a gazda szervezetre nézve minimalizálható az „OFF-target” hatás, tehát hogy a képzett kis RNS(ek) a RISC-be épülve más (gazda-) gének RNS termékeit is eltalálhassák (Tiwari et al., 2014). Mivel az amiRNS technológia során csak egy darab ilyen kis RNS-t termeltetünk, ez az esély szinte nullára csökkenthető, mivel a nem kívánt géncsendesítési hatásokat génadatbázisok felhasználásával ellenőrizni tudjuk (Dai és Zhao, 2011). A második nagyon fontos előnye a technológiának, hogy az amiRNS-ek biogenezise teljesen megegyezik a miRNS-ével, ellentétben az IR és az antiszensz gén technológiákkal, ahol a létrejövő kis RNS-ek biogenezise a siRNS útvonalon valósul meg (Tiwari et al., 2014). Ez pedig egy nagyon fontos momentum abból a szempontból, hogy az utóbbi két (siRNS alapú) technológia nem működik (vagy nem hatékonyan) alacsony hőmérsékleten, mivel 15 °C alatt a siRNS útvonal bizonyos növényekben gátolva van (Szittyá et al., 2003). Ez szántóföldi növények esetében meglehetősen hátrányos a vírusokkal szembeni védekezés szempontjából, hiszen az elsődleges fertőzések időszakában pont ilyen alacsony hőmérséklettel számolhatunk.

A technológiát mindemellett policisztronikus konstrukcióban is alkalmazhatjuk, amely azt jelenti, hogy több prekursorba különböző amiRNS-eket helyezünk el, majd ezeket egy promóter segítségével policisztronikusan expresszáltatjuk. Ez lehetőséget nyújt arra, hogy egy adott élőlényben több

különböző gént is lecsendesítsünk egy transzformációs kazettával. Ugyanakkor vírus csendesítés esetén is előnyt jelent, ha több amiRNS-t expresszáltatunk a növényben, amik a vírus különböző génjeire (vagy egy génjére több) specifikusak, kisebbre csökkentve ezzel a vírus esetleges mutációja által bekövetkező rezisztencia törést. Az amiRNS-eket elhelyezhetjük egy már létező policisztronikus miRNS prekurzorba (Fahim et al., 2012), vagy létrehozhatjuk úgy is, hogy egymás után klónozzunk több, különböző amiRNS-eket hordozó prekurzorokat (Kung et al., 2012).

A hatékony géncsökkentés érdekében nem csak a magas expressziót biztosító irányító szekvenciák (promóter) megválasztása fontos, hanem a megfelelő prekurzor kiválasztásra is oda kell figyelni. Ennek praktikussági okai vannak, úgymint az átalakítás egyszerűsége, a prekurzor nagyságának tekintetében, de ennél sokkal fontosabb, hogy olyan prekurzort válasszunk, amely nagy mennyiségű amiRNS felhalmozódást tesz lehetővé. A különböző pre-miRNS-ekről azonos transzkripciós aktivitás mellett is különböző mértékű miRNS felhalmozódást tapasztalhatunk, amely a sajátos másodlagos RNS szerkezetükből fakad. Ez azt jelenti, hogy egy adott pre-miRNS szerkezetet a miRNS érésben résztvevő enzimek nagyobb affinitással kötnek és dolgoznak fel, mint egy másik pre-miRNS-t (Mateos et al., 2010; Werner et al., 2010). Mindezek figyelembevételével a hatékonyabb RNS csökkentés létrehozásához érdemes hatékonyabban érő miRNS prekurzorokat alkalmaznunk.

2.5.3.1 Az amiRNS technológia felhasználása növényi vírusokkal szemben

Az első amiRNS prekurzorral kialakított vírusrezisztenciát 2006-ban publikálták, amit tarlórépa sárga mozaik (*Turnip yellow mosaic virus – TYMV*) és tarlórépa mozaik potyvírusokkal (*Turnip mosaic virus – TuMV*) szemben hozták létre. A vírusok RNS interferencia szupresszoraira tervezett amiRNS-eket *Arabidopsis thaliana*-ban termeltették. A transzgenikus növényeket a fertőzést követően 15 és 24 °C-on vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy az amiRNS-ek szintjében nincs számottevő különbség a két hőmérsékleten és az általuk nyújtott rezisztencia ugyanolyan hatékony alacsonyabb hőmérsékleten (Niu et al., 2006). Ellentétben a siRNS alapú (pl. inverted repeat) technológiákkal, ahol a siRNS-ek biogenezeise alacsony hőmérsékleten gátolva van egyes növényfajoknál (Szittyá et al., 2003).

A következő években sorban jelentek meg a különböző növényfajokban, különböző vírusokra kialakított amiRNS alapú rezisztenciákról szóló publikációk (Fondong et al., 2016). Egy 2007-ben megjelent cikk bizonyította, hogy a dohány

növényben CMV-re specifikus amiRNS konstrukció sokkal hatékonyabb a siRNS alapú inverted-repeat konstrukciónál (Qu et al., 2007).

A vírusok magas mutációs rátájuk miatt egy amiRNS gátló hatása alól könnyen kitörhetnek. Ezért a kutatóknak eszébe jutott, hogy több amiRNS prekursor összeépítésével – amikben különböző célszekvenciára specifikus amiRNS-ek találhatóak – hatékonyabb és tartósabb rezisztenciát lehetne elérni. Az első ilyen publikáció 2011-ben jelent meg, amiben görögdinnye ezüsfoltosság vírusra (*Watermelon silver mottle virus* – WSMoV) alakítottak ki rezisztenciát *Nicotiana benthamiana*-ban. Az *Arabidopsis thaliana* miR159a prekursorára alapozott policisztronikus konstrukcióval három különböző amiRNS-t termeltettek a növényben a vírus replikáz RNS-ére, amivel teljes rezisztenciát tudtak elérni. A vírust 28 nappal a fertőzést követően sem tudták kimutatni a növényből (Kung et al., 2012). Ugyanebben az évben jelent meg egy publikáció, amiben szintén egy policisztronikus amiRNS konstrukcióval alakítottak ki rezisztenciát búza csíkos mozaik vírusra (*Wheat streak mosaic virus* – WSMV) búzában. A kísérlet érdekessége, hogy a konstrukciót nem egyforma prekursorokból állították elő, hanem egy eredetileg is policisztronikus, 5 miRNS-t tartalmazó pri-miRNS-ből (osa-miR395) (Fahim et al., 2012).

2.6 A növényi kis RNS-ek humánbiológiai hatásai

A növényekben termelődő, vagy mesterségesen termeltetett kis RNS-ekről sokáig azt gondolták, hogy gyorsan lebomlanak, intakt formában nem szívódnak fel és a fogyasztó szervezetekre nézve semmi féle hatással nem lehetnek. Nem olyan régen azonban kiderült, hogy a növényi miRNS-ek hatással lehetnek a humán szervezet működésére is, ugyanis a vérplazmából, azon belül is mikrovezikulákból sikerült kimutatni a jelenlétüket (Liu et al., 2017). A konzervatív 159-es miRNS jótékony hatásaként említhető, hogy az emlőrák daganatok növekedését képes gátolni egy a daganatban felül expresszáldó transzkripció faktor gátlásával (Chin et al., 2016). A miR168-as konzervatív növényi miRNS-ről pedig bebizonyosodott, hogy az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) eltávolításáért felelős gén csendesítésével képes megemelni a vérünk koleszterin szintjét (Zhang et al., 2012). Bár hozzá kell tenni azt, hogy ezek a hatások ugyan kísérletesen bizonyítottak, de közvetlenül a növényi eredetű táplálékból felszívódó miRNS-ek által nem valószínű, hogy valóban be is következnek, hiszen a leközölt kísérletekben nagy mennyiségű szintetikus miRNS-

ekkel etették a kísérleti állatokat és még így sem volt drasztikus hatásuk az adott emlős cél mRNS-re. Egyetlen egy példa van az irodalomban arról, hogy növényi táplálék elfogyasztását követően emlős szervezetben egy kis RNS képes legyen mérhető biológiai aktivitást mutatni, mégpedig a japán lonc (*Lonicera japonica*) miR2911-es, nem kanonikus miRNS-e, amely a növény egyik riboszómális RNS-ének karjáról érik ki és meglehetősen nagy mennyiségben van jelen a virágzatában. Mindezek mellett a belőle létrehozott főzetben is nagyon stabilan megmarad és az azt elfogyasztó állatok (egerek) vérplazmájából és tüdejéből is kimutatható volt. A kísérletekben bebizonyították, hogy ez a távol-keleten, influenzás megbetegedésekre is előszeretettel használt tea képes gátolni az influenza A vírusok szaporodását az említett miRNS molekula segítségével az RNS interferencia mechanizmusán keresztül (Zhou et al., 2015).

2.7 miRNS-ek keresése új generációs szekvenálással

A nem sokkal több, mint egy évtizede teret hódító új generációs szekvenálási technikák (NGS – Next Generation Sequencing) segítségével lehetőségünk nyílik a nukleinsavak elsődleges szerkezetének (genetikai kód) sokkal magasabb szintű megismerésére. Az ide tartozó technikákat nevezik „nagy áteresztő képességűnek” is, amelyek lehetővé teszik, hogy párhuzamosan több mintát is képesek legyünk szekvenálni. Így ma már egy élőlény teljes genomjának megszekvenálását akár egy hét alatt is elvégezhetjük. A technológia lényege, hogy a DNS-t rövid ~100 bázispár hosszúságú darabokra törik és azokhoz ismert szekvenciájú DNS adaptereket kapcsolnak, majd ezekről az ismert DNS szekvenciákról indítják el a szekvenálást. A fejlett robottechnika lehetővé teszi, hogy akár párhuzamosan több millió ilyen szekvenálási folyamat is folyjon egyszerre egy reakcióban, amiket a számítógéphez kapcsolt fotoszenzorok követnek nyomon. A különböző leolvasások ezt követően egymáshoz illeszthetők és az átfedő szekvenciák alapján képesek vagyunk összerakni a kiinduló teljes DNS genomot (Schuster, 2008).

Ez a technológia ugyanakkor nem csak a genomban kódolt genetikai információ megismerésére ad lehetőséget, hanem segítségével a kódolt információk RNS szintű megnyilvánulását is nyomon követhetjük. A kis RNS-ek szekvenálása esetében, azokra szintén ismert szekvenciájú RNS adaptereket csatolnak, majd az ezekről indított specifikus primerekkel reverz-transzkriptáz segítségével készítenek egy kópia DNS-t (cDNS). Az adapterekre specifikus oligókkal felszaporítják a kis

RNS-ek kódját tartalmazó cDNS-eket, amiket aztán az előbb leírtak szerint megszekvenálnak. A szekvenálásban kapott leolvasások nem csak az adott kis RNS szekvenciáját árulják el, hanem mennyiségi meghatározást is lehetővé tesznek. Ezáltal lehetőségünk nyílik arra, hogy a növény különböző szöveteiben nyomon követhessük az ott expresszálandó kis RNS-eket és azokat kvantitatívan is jellemezzük. Illetve lehetőségünk nyílik a kis RNS-ek prekursorait is megkeresni, ha a kis RNS-eket a megszekvenált genomra illesztjük (Harbers és Kahl, 2011).

2.8 Az árpa *Agrobacterium* - közvetítette transzformációja

Hatékony árpa transzformáció kivitelezéséhez mindenekelőtt egy jól működő *in vitro* regenerációs rendszerre van szükség. A szövettenyésztésnek számos befolyásoló tényezője lehet, úgymint a genotípus, a kiindulási szövet, annak kora, fejlettsége, és a táptalaj összetétel. A genotípust tekintve a kétsoros árpafajták kallusz indukciója alapvetően sokkal jobb a hatsoros típusokhoz képest. Jelenleg a legsikeresebben szövettenyészhető és transzformálható kétsoros árpafajta a 'Golden promise' (Bo et al., 2015). A kiindulási szövetet (explantum) tekintve számos megközelítéssel találkozhatunk. Az egyik leghatékonyabb explantum az érett embrió (Lupotto, 1984), de ovulumból (Holme et al., 2008), hajtás merisztémából (Zhang et al., 1999), éretlen virágzatból (Şener et al., 2008), levélből (Becher et al., 1992), vagy szár náduszból (Sharma et al., 2007) is van lehetőség az *in vitro* szövettenyésztésre több-kevesebb sikerrel. A legelterjedtebb módszer mégis az éretlen embrióból (Goldstein és Kronstad, 1986) történő kallusz indukció, ami nem csak a növényregeneráció szempontjából kiváló választás, de a transzformációs hatékonyság is sokkal magasabb ezen explantum esetében (Bo et al., 2015).

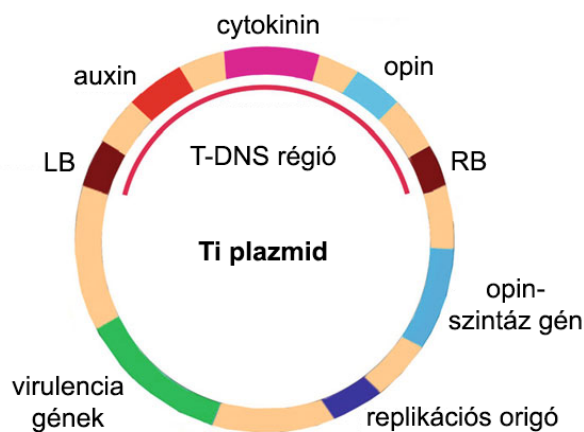
Az éretlen embrióból történő kallusz indukció során ~10-12 napos embriókat izolálnak, melyek mérete megközelítően 1,5-2,5 mm átmérőjű. Az embriókról legtöbb esetben azonnal eltávolítják az embriogén axist, amely magába foglalja a fejlődő hajtás- és gyökércsúcsot és csak a szkutellum szövetrészt alkalmazzák explantumként. (Tingay et al., 1997).

A táptalaj a szénforrás (cukor), a mikro- és makro elemek mellett általában tartalmaz még különböző vitaminokat és hormonokat. A szomatikus embriogenezis indukciójához legáltalánosabban használt növényi hormon a 2,4-D (2,4-Diklorofenoxi-ecetsav) és a Dicamba. Mindkettő anyag a szintetikus auxinok közé tartozik. A kalluszosítás időtartama 3-6 hét, majd az azt követő auxin megvonással, vagy

csökkentéssel indukálható az embriogén kallusz sejtek ontogenezise (Bhojwani és Dantu, 2013).

Az *Agrobacterium tumefaciens* Gram negatív, talajlakó, baktérium, mely természetes körülmények között tumor képződést indukál a növényi szövetekben. A baktérium tartalmaz a genomján felül egy extrakromoszómális cirkuláris DNS-t (Ti plazmid) (4. ábra), melynek egy darabját (T-DNS – tumor indukáló DNS) – amelyet specifikus, 25 nukleotidos határoló szekvenciák szegélyeznek (LB - left border; RB - right border) – képes bejuttatni a növényi sejtmagba és azt annak genomi DNS-ébe integrálni.

A Ti plazmidon helyezkednek el a növényi jelmolekulákra (pl. acetosyringon) aktiválódó virulencia gének (*vir*), melyek bejuttatják a T-DNS-t a sejtmagba és megvédik azt a növényi DNS bontó enzimektől. A Ti plazmid tartalmaz egy speciális aminosav (opin) szintéziséért felelős gént is, mely elengedhetetlen a baktérium növekedéséhez. A kutatók igyekeztek kihasználni ezt a baktérium által képviselt DNS beviteli rendszert, és megalkották a „bináris” vektort, amelyet olyan replikációs origóval és szelekciós markergénnel láttak el, amellyel képesek lettek mind *Agrobacterium*-ban, mind *E. coli* ban is felszaporítani a plazmidot. Az *E. coli*-ban történő felszaporítás természetesen a vektor klónozása során jelent előnyt.



Bhojwani, S. S. et al., 2013

4. ábra: Az *Agrobacterium tumefaciens* Tumor indukáló (Ti) plazmidja a T-DNS-sel. LB – 'left border'; RB – 'right border'

Mindezek mellett megfosztották a Ti plazmid T-DNS-ét a tumor indukáló génektől és helyükre integrálták a bejuttatni kívánt gének DNS-ét. A '90-es évek közepén megjelentek az úgynevezett „szuper bináris” vektor rendszerek. Ezek újdonságát az adja, hogy több *vir* gént is alkalmaztak, melyek megnövelik a T-DNS beépülés esélyét a növényi genomba. Mindezek mellett a rendszerben a *vir* gének és a T-DNS

külön plazmidon helyezkednek el, megnövelve ezzel a T-DNS „helykapacitását” (Bhojwani és Dantu, 2013).

Az első árpa éretlen embrióból kiinduló, szuper virulens *Agrobacterium* törzset (AGL-1) alkalmazó árpa transzformációs rendszert 1997-ben írták le, melynek hatékonysága 4,2% volt (Tingay et al., 1997). Ezt a Golden promise fajtára leírt rendszert azóta számos ponton módosították, tökéletesítették, melynek transzformációs hatékonysága eléri a 25%-ot (Bartlett et al., 2008; Harwood, 2014).

2.9 DNS vírus átviteli rendszerek

Mesterséges vírusfertőzési módszerekre nem csak azért van szükségünk, hogy megkönnyítsük a vírusfertőzési tesztek, hanem azért is, hogy biztosan tudjuk, milyen törzssel dolgozunk. A WDV esetében a kabócák elméletileg nem hordoznak más vírusokat WDV-n kívül. A természetből begyűjtött rovarvektorok viszont különböző WDV törzseket hordozhatnak, melyek megnehezíthetik a velük történő molekuláris munkákat. Ezért érdemes egy jól jellemzett, ismert szekvenciájú törzssel dolgozni.

A fizikai úton nem terjedő növényi vírusokkal történő provokatív fertőzés általában nem túl egyszerű. A WDV-t, vagy más geminivírust mechanikai úton (fertőzött növényi nedvvel) nem lehet átvinni másik növényre. Ennek következtében a kutatók számos megközelítést kidolgoztak a sikeres átvitel kivitelezésére. Meglehetősen extrém megoldásokról is olvashatunk, mint például a '80-as évek elején, a szintén csak kabóccával terjedő MSV geminivírusra leírt elektro-endozmózis alapú módszer: ennek lényege, hogy az izolált vírus DNS-t, mely negatív töltésű, egy puffer közvetítette elektromos térben „vándoroltatták” bele a megvágott növény levelébe (Polson és von Wechmar, 1980). A cikk elég hatékony vírusfertőzési rendszerről számol be, de még senki sem ismételte meg ezt az elektro-endozmózis alapú átvitelt. Azóta a közvetlen (génpuska) és közvetett (*Agrobacterium*) génbeviteli rendszerek felfedezésével és fejlődésével számos új megközelítéssel találkozhatunk a szakirodalomban.

2.9.1 Vírus átvitel közvetett és közvetlen biotechnológiai módszerekkel

Mind *Agrobacterium*-mal, mind génpuskával történő átvitel esetében egy plazmid vektorba klónozott ~1,5-szeres (1,5 MER) DNS vírust alkalmaznak. Ha a bejuttatott T-DNS-be csak az „egyszeres” vírusgenom lenne klónozva, akkor a felnyitás helyén

a kód is „megszakadna”, a vírus nem tudna szaporodni. Viszont ha a teljes vírus mellé klónozzuk folytatólagosan a vírus felét, akkor a 1,5 MER-es vírusgenom két végén lévő homológ részek lehetőséget nyújtanak a növényi sejtmagban arra, hogy homológ rekombinációval létrejöjjön a teljes méretű (egyszeres), cirkuláris DNS vírus, ami aztán képes lesz a sejtmagban történő szaporodásra (Dale et al., 1989).

Ha rendelkezünk egy ilyen 1,5 MER-es vektorba klónozott konstrukcióval, akkor azt bejuttathatjuk a növényi sejtbe közvetlenül génpuskával (Gal-On et al., 1997; Garzón-Tiznado et al., 1993), vagy közvetetten *Agrobacterium*-mal (Dale et al., 1989; Ramsell et al., 2009). A fertőzés hatékonyságának egyik sarkalatos pontja az inokulált növény fejlettségi állapota (1-4 napos csíranövény) és azt is megállapították, hogy a geminivírusokkal leghatékonyabban fertőzhető növényi részek a merisztematikus régiók (Dale et al., 1989).

A génpuskával kivitelezett fertőzés esetében a vírust tartalmazó vektor konstrukciót ~1 mikrométeres wolfram vagy arany részecskékre tapasztják rá. Azokat egy makrolövedékre helyezik és magas nyomás segítségével kilövik. A makrolövedéket egy lyukas stopplemez megállítja, majd a levágódó wolfram vagy arany részecskék belefúródnak a növény levéllemezébe és több kevesebb sikerrel a növény sejtmagjában állnak meg bejuttatva ezzel a rájuk kötött virális DNS-t (Garzón-Tiznado et al., 1993).

Az *Agrobacterium*-mal történő DNS vírus fertőzés a kivitelezés szempontjából elég sokrétű. A fertőző klónt hordozó *Agrobacterium* oldatot belepréselhetjük csíranövények (2-6 cm) levéllemezébe; vagy egyszerűen 2-5 napos csíranövényeket márthatunk az *Agrobacterium* oldatba; vagy vákuumharang alatt csírázó magokba infiltrálhatjuk az oldatot. Egy svéd kutatócsoport (Ramsell et al., 2009) számos módszert kipróbált egy WDV árpa törzset tartalmazó „agrofertőző” konstrukcióval, ám csak egyetlen módon tudtak WDV fertőzött árpa növényt előállítani: az egy éjszakán át vízben áztatott árpa magok csíra felőli részét bekenték szilárd táptalajon előre felnövesztett *Agrobacterium*-mal, majd a csíra részen 3-5 szűrást ejtettek túvel. A magokat az inkubációs idő (2-3 nap, 23 °C, sötét) elteltével elvetették, majd molekuláris vizsgálatoknak vetették alá a ~4 hetes növényeket, amik között árpa fajtától függően 6-29%-ban tudták detektálni a vírust.

2.9.2 Vírus átvitel rovar vektorral

Ha már rendelkezünk WDV-vel fertőzött növényvel, akkor rovarvektorral tudjuk átvinni a vírust egyik növényről a másikra. Ehhez mindenképp szántóföldről begyűjtött csíkos gabonabóccára (*Psammotettix alienus* Dhalbom) van szükségünk, amiket érdemes néhány generáción át a vírusra nem fogékony növényeken (kukorica, árva rozsok, réti perje) nevelnünk, ez által megszabadulunk a WDV fertőzöttségtől a rovar utódnemzedékében. Ezt követően a fertőzött növényekre helyezzük a rovar egy vékony hálóval elválasztva a külvilágtól, vagy közvetlen a növényekre helyezett mikroizolátorokba, ahol ~1 hetes táplálkozást követően a rovarok fertőzőképessé válnak, amik ezután egy hetes időszakra az egészséges növényre helyezve képesek lesznek átadni a vírust (Tóbiás et al., 2008).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Növényi anyagok

A különböző agroinfiltrációs kísérletekhez, két-három hetes *Nicotiana benthamiana* növényeket használtunk, melyeket növénynevelő kamrákban (Versatile Environmental Test Chambers; Sanyo, Tokyo Japan) 23 °C-on, 14 órás nappali (50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősség) és 10 órás éjszakai ciklus alkalmazásával neveltünk Jiffy tápkockákban.

Az agrobaktériumos transzformációhoz használt árpa növényeket (*Hordeum vulgare* cv. 'Golden promise') szintén Sanyo növénynevelő kamrákban neveltük 15 °C-os nappali (16 óra, 50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősség), 12 °C-os éjszakai (8 óra, sötét) hőmérsékleten.

A búza kis RNS könyvtárak előállításához felhasznált növényeket (*Triticum aestivum* cv. 'Bánkúti B35 és B52'; *Triticum spelta*) üvegházban neveltük fel 23-28 °C-os hőmérsékleten tartva. A megtermékenyülés időpontját kalászonként az első portokok megjelenésétől számoltuk. A 10-20-30 napos magokat szedést követően -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.2 Vírusvektorok nevelése

Az árpaföldekről begyűjtött, kifejlett csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dhalbom) populációt 23 °C hőmérsékletű növénynevelő kamrában több nemzedéken át neveltük árpa növényeken (*H. vulgare* cv. 'MV Jubilant') 14 órás nappali (50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fény) és 10 órás éjszakai periódust váltakoztatva. A rovarokat a külvilágtól egy vékony, 0,1 mm falvastagságú hálóval választottuk el.

3.3 Molekuláris munkák

3.3.1 *Escherichia coli* baktérium törzsek nevelése és plazmid kinyerés

A molekuláris klónozásokhoz használt plazmidokat *Escherichia coli* DH5 α törzsekben szaporítottuk fel, amelyek neveléséhez szilárd vagy folyékony LB táplevest (2. sz. Melléklet) használtunk. A baktériumokat 37 °C-os sötét termosztátban neveltük. A plazmid kinyeréshez használt folyékony kultúrákat egy éjszakán keresztül rázattuk (300 fordulat/perc) sötétben. A baktériumokban

felszaporított plazmidokat High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) felhasználásával vontuk ki a gyártó utasításai szerint.

3.3.2 DNS kivonás és PCR

A növényekből és a kabócákból történő DNS kivonásokat Extraction solution és Dilution solution (Sigma-Aldrich, E7526 és D5688) oldatok felhasználásával végeztük. Az ~5-10 mg növényi szövetet, vagy a 3-4 kabócát 100 µl Extraction solution-ba raktuk, majd 3 mm-es csapágygolyóval homogenizáltuk 1,5 ml-es eppendorf csövekben mini BeadBeater-96 (BioSpec, USA) labormalom felhasználásával. A homogenizált mintákat ezt követően 95 °C-os termosztátba helyeztük 12 percre, majd jégen lehűtöttük. Hozzá adtunk 100 µl Dilution solution oldatot és alaposan összekevertük. Ezután centrifugáltuk 30 másodpercig, majd a DNS-t tartalmazó, tiszta felülúszót új eppendorf csövekbe helyeztük, amelyből 1-1 µl-t raktunk a PCR reakciókba.

A PCR reakciókat Phire II Green enzimmel (Thermo Fisher, Waltham, USA) végeztük 50 µl-es végtérfogatban a gyártó által előírt protokoll alapján. Amennyiben a PCR terméket később beklónoztuk, akkor szintén a gyártó által forgalmazott Phusion High Fidelity enzimet használtuk.

3.3.3 DNS emésztés

A plazmidok és a PCR termékek emésztését a gyártó (Thermo Fisher, Waltham, USA) által, az adott enzimhez ajánlott pufferben végeztük 60 µl-es végtérfogatban 2 µl enzimet felhasználva emésztésenként. A reakciókat 1,5 ml-es eppendorf csövekben egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on vízfürdőben.

3.3.4 DNS elektroforézis és DNS visszaizolálás gélből

Az egyes klónozási lépésekhez szükséges DNS-eket, illetve a PCR reakciókat 1,2%-os agaróz gélben (1x TBE, 2. sz. Melléklet) választottuk szét molekulaméret szerint. A futtatásoknál 6x Loading Dye (Thermo Fisher, Waltham, USA) festéket kevertünk a mintákhoz. A szétválasztást követően a méretek beazonosításához GeneRuler 100 bp plus, vagy 1 kb (Thermo Fisher, Waltham, USA) molekula markereket használtunk. A gélből visszaizolált DNS-t GFX™ PCR DNA and Gel Band

Purification Kit (GE Healthcare) felhasználásával a gyártó által előírt protokoll alapján tisztítottuk ki.

3.4 *Agrobacterium tumefaciens* transzformáció

Az *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 és AGL-1 törzseibe hőkompetens módon (An et al., 1989) juttattuk be a kívánt bináris plazmidokat. Az *Agrobacterium*-ot éjszakán át növesztettük 28 °C-on, 250 rpm-en rázatva YEB tápoldatba. Majd 2 ml-t reggel beleoltottunk 50 ml friss YEB tápoldatba, amit azonos körülmények között növesztettünk tovább, amíg a sejt denzitás elérte az $OD_{600}=0,5-1,0$ értéket. Ezt követően a sejtuszpenziót jégen lehűtöttük és 4 °C-on, 3000 g fordulaton 5 percet fugáltuk. A felülúszót leöntöttük és az így kapott kompetens sejteket 1 ml 20 mM-os $CaCl_2$ oldatba vettük fel, melyeket 100-100 μ l-enként eppendorf csövekben mélyhűtöttük (-70 °C).

A transzformáció során 1 μ g plazmidot adtunk 100 μ l fagyasztott kompetens sejthez, majd azokat jégen felolvasztottuk. Ezt követően folyékony nitrogénben újra lefagyasztottuk és 10 percre 37 °C-os kamrába helyeztük őket. A hősokkot követően 1 ml YEB tápoldatot mértünk a sejtekre az eppendorf csőben, majd 2 órát növesztettük őket 28 °C-on, 250 rpm-en rázatva. A szaporítást követően a sejteket lefugáltuk, leszívtuk róluk a felülúszó folyadékot, amiből csupán 100 μ l-t hagyunk meg, amiben a sejteket felszuszpendáltuk. Ezt követően az összes sejtet kikentük a megfelelő antibiotikumot tartalmazó szilárd YEB táptalajra, amin 28 °C-on két napig növesztettük őket sötétben.

3.5 *Nicotiana benthamiana* növények agroinfiltrációja

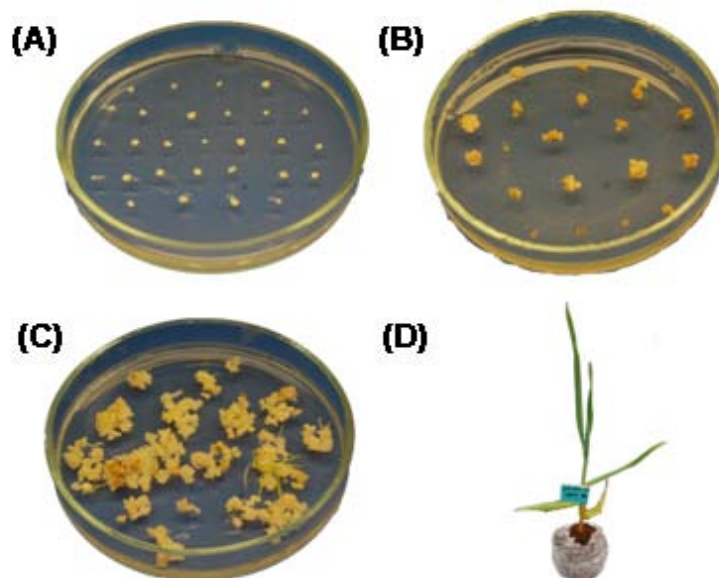
A dohány (*Nicotiana benthamiana*) növények levelit *A. tumefaciens* C58C1-es törzsével infiltráltuk (Várallyay et al., 2010), amikbe azt megelőzően a bináris vektorokat hőkompetens módon transzformáltuk (An et al., 1989). Az egy éjszaka alatt felnövesztett baktériumokat 0,01 M $MgCl_2$ -t és acetosyringont tartalmazó MES pufferrel hígítottuk a kívánt koncentrációra, melyet spektrofotométer segítségével állítottunk be. A mesterséges miRNS-ek és a GFP-szenzor konstrukciók esetében ez az érték $OD_{600}=1$, a pRep konstrukció esetében pedig $OD_{600}=0,3$ volt. Ezt követően a különböző baktérium oldatokat 1:1 arányban kevertük össze az egyes kísérletekben. Az *Agrobacterium* oldatot egy 1 ml-es fecskendő segítségével préseltük bele dohány növények levéllemezébe. Az infiltrált levelekben a GFP expressziót 3 nap elteltével

vizsgáltuk UV lámpa (B-100AP 100 Watt High Intensity Lamp; UVP, LLC, Upland, CA 91786, USA) alatt.

3.6 Árpa *Agrobacterium*-közvetített transzformáció

Az árpa transzformációs kísérleteket Bartlett és munkatársai (2008) által leírt módszer alapján dolgoztuk ki. A megközelítően 1,5-2 mm átmérőjű embriókat tartalmazó 'Golden promise' árpa magokat eltávolítottuk a kalászsóróról, majd sterilizáltuk őket. 70%-os etil alkoholban 1-2 percig, majd 50%-osra hígított hypó (kereskedelemben forgalmazott) oldatban 25 percig rázattuk. A sterilizálást követően steril vízben mostuk a magokat háromszor. Az izolálás során az embrióról eltávolítottuk az embriogén axist, majd a szkutellumokat CI kalluszosító táptalajra (5./A ábra) helyeztük vágási felülettel felfelé. A transzformációhoz előző éjjel leoltottunk 5 ml YEB tápoldatba a pCUBiVirusBuster171 vektort tartalmazó AGL-1 *A. tumefaciens* baktériumot. A tenyészetet másnap reggel lecentrifugáltunk (4000 rpm, 23 °C) és OD₆₀₀=1 koncentrációra hígítottuk folyékony CI tápoldattal.

A baktérium szuszpenziót 2 órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd apró cseppekben a CI táptalajra izolált szkutellumokra juttattuk. Tizenöt percet szárítottuk őket steril fülkében, majd áthelyeztük a fertőzött explantumokat friss CI



5. ábra: Az *Agrobacterium* közvetített árpa transzformáció lépései. (A) éretlen embriók izolálása, fertőzése; (B) embriogén kalluszok előállítása szelektív táptalajon; (C) növényregeneráció; (D) tápkockába kiültetett transzgénikus növény.

táptalajra és 23 °C-os, sötét termosztátba inkubáltuk őket 3 napig. Az inkubációt követően az embriókat átraktuk 50 mg/l hygromicint tartalmazó CI-50 szelekciós táptalajra (5./B ábra) vágási felülettel lefelé, amin 6 hetet töltöttek el, miközben kéthetente friss táptalajra helyeztük őket. A kalluszosítási folyamatot követően átmeneti TR-50 táptalajra (5./C ábra) raktuk a kalluszokat és 16 óra fényt ($50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősség) biztosítottunk számukra. Három hétig hetente friss TR-50 táptalajra raktuk át őket, mialatt a kalluszok helyenként bezöldültek. A kalluszokból fejlődő 2-3 mm-es növénykéket kallusszal együtt a regenerációs (RG-0) táptalajra helyeztük. Az 1-2 hetes, gyökeres, 5-7 cm-es növényeket Jiffy tápkockákba (5./D ábra), majd cserépbe ültettük. A felhasznált táptalajok receptjeit az 2-3. sz. Melléklet tartalmazza.

3.7 Árpa növények fertőzése WDV-vel

A WDV mechanikailag nem vihető át egyik növényről a másikra csak kizárólag rovar vektorral. Ezért létrehoztunk egy mesterséges vírusfertőzési rendszert, amely által egy ismert genomszekvenciával rendelkező vírus izolátummal tudjuk megfertőzni a növényt.

3.7.1 *Agrobacterium*-közvetített WDV fertőzés

A pPZP201WDV1,5MER konstrukcióval transzformált AGL-1 *Agrobacterium*-ot két napon át növesztettük kanamicint és rifampicint tartalmazó szilárd YEB táptalajon. Az inokulációt megelőző nap ~100 db 'Golden promise' árpamagot egy éjszakán keresztül steril vízbe áztattunk. A következő nap a megduzzadt és felpuhult magok háti oldalán lévő, embrió felőli részt vékonyan bekentük a fertőző konstrukciót hordozó *Agrobacterium*-mal, majd egy vékony tűvel (BBRAUN, Sterican, 30G) 3-5 szúrást ejtettünk az embrió különböző részein. A magokat benedvesített steril szűrőpapíron, petricsészében lezárva sötétbe helyeztük és 3 napig 23 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációt követően, a csírázó magokat földbe vetettük. Négy hét elteltével a növényekben WDVrepDetF-WDVrepDetR oligókkal végzett PCR-rel vizsgáltuk meg a WDV jelenlétét.

3.7.2 WDV fertőzés kabóca vektorral

Az *Agrobacterium* segítségével létrehozott WDV fertőzött 4-5 hetes növényekre 3,5 cm hosszú, 3 cm átmérőjű, henger alakú, fél oldalán vékony hálóval zárt

mikroizolátorokat (6. ábra) helyeztünk, majd a két végét a levelet átölelő szivacs korongokkal zártuk le. A 3-3 kabócat tartalmazó mikroizolátorokat földbe szúrt fapálcikákhoz rögzítettük. Növényenként 2-2 izolátort alkalmaztunk. A kabócékat 1 hétig hagytuk táplálkozni a WDV-fertőzött növényeken, majd szintén egy hetes időintervallumra áthelyeztük őket az egészséges transzgenikus vonalainkra. Ezt követően WDV-RepDetF és WDV-RepDetR oligók felhasználásával PCR-rel kimutattuk a vírus jelenlétét a növényből és a kabócékból is egyaránt.



6. ábra: Mikroizolátoros WDV átvitel árpa, kabóca vektorral

3.8 RNS izolálás, northern és kis RNS northern hibridizáció

Az infiltrált dohánylevelekből és a transzgenikus árpa növényekből a totál RNS-t TRI® Reagent RNA Isolation oldat segítségével vontuk ki a gyártó utasításait követve (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A kivonások során ~100 mg levélmintát folyékony nitrogénben porítottunk el. A kivont RNS-ek minőségét minden esetben NanoDrop 2000 spektrofotométerrel ellenőriztük.

A folyékony nitrogénben porított búzamazagokból (~100 mg) a totál RNS-t Directzol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research Corp, Tustin, USA) felhasználásával izoláltuk a gyártó által előírt protokoll alapján. Az RNS minták minőségét Bioanalyzer 2100 készülék és RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent, Santa Clara, CA) felhasználásával vizsgáltuk meg a gyártó előírásait követve.

A WDV replikáz RNS-ét a laborunkban használt protokoll alapján northern hibridizációval detektáltuk (Varallyay et al., 2014). Mintánként 5 µg RNS-t használtunk, amit 1,2%-os formaldehides 1x MAE agaróz gélben futtattuk meg. Majd a Nytran NX membránra (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) blottolt RNS-eket Decalabel DNA labelling kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) segítségével, a gyártó protokollja szerint radioaktívan jelölt specifikus

PCR termékkel (WDVrepDetF - WDVrepDetR – 413 nukleotid) hibridizáltattuk 65 °C-on Church pufferben (2. sz. Melléklet).

A kis RNS northern hibridizációhoz (Varallyay et al., 2008) 10 µg totál RNS-t használtunk fel mintánként mind az infiltrált dohánylevelek, mind a transzgenikus árpa növények és mind a búzamazag minták esetében, amiket 8 M ureát tartalmazó 12%-os polyakrilamid 1x TBE gélen futtatunk meg. A gélből ezt követően kapilláris blot segítségével az RNS-eket Nytran NX membránhoz (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) kötöttük. Ezt követően az RNS-eket kémiai keresztkötést alkalmazva (Pall et al., 2007) stabilan rögzítettünk a membránhoz. Az infiltrált dohánynövényekből kivont RNS-eket UV transilluminátorral rögzítettük a membránhoz a blottolást követően. Az amiRNS-ek és a miRNS-ek detektálásához specifikus DNS oligókat rendeltünk, kivéve a miR159, a miR171 és a miR164-es miRNS-eket, melyek esetében LNA (locked nucleic acid) oligót használtunk. A specifikus próbákat [γ 32P]ATP izotóppal jelöltünk fel. A hibridizációt 35 °C-on (LNA oligó esetében 50 °C) végeztük ULTRAHyb-Oligo (Ambion Inc., Austin, TX, USA) pufferben a gyártó utasításait követve. Az infiltrált dohánynövényekből kivont minták esetében a kis RNS hibridizációt általunk készített kis RNS hibridizációs pufferben (Varallyay et al., 2008) végeztük. A próba által kibocsátott radioaktív jelet X-RAY röntgen filmmel detektáltuk. A polycisztronikus konstrukció (VirusBuster171) által árpában (stabilan), vagy dohányban (tranzienzen) expresszált amiRNS-eket egy membránon hibridizáltuk. A hibridizációk előtt az egyes próbákat lefőztük a membránról (0,1% SDS, 5 mM EDTA).

3.9 Búza (*Triticum aestivum* L.) kis RNS könyvtárak előállítás

A miRNS-ek fontos fejlődésbiológiai feladatokat látnak el, ezért a fejlődésben lévő szemtermés kiváló alanyként szolgálhat új miRNS-ek felkutatására. Ezért porzástól számítva 10-20-30 napos búzamazagokból két biológiai ismétlésben készítettünk kis RNS könyvtárakat, amelyek lehetőséget adnak arra, hogy az azokban nagy mennyiségben jelenlévő miRNS-ek prekursorait genomadatbázisok felhasználásával azonosítsuk. A kísérletben két kenyérbúza vonalat (Bánkúti B35 és B52) és egy tönkölybúzát (*Triticum spelta*) használtunk fel.

A kis RNS könyvtárakat az Illumina TruSeq® Small RNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA) segítségével készítettük el. A könyvtárakat kétféleképpen hoztuk létre, szimplán totál RNS-ből (UD-GenoMed, Debrecen által

létrehozva), illetve a kis RNS frakció (15-30 nukleotid) visszaizolálásával is (Mathioni et al., 2017). Az így elkészített könyvtárakat ezt követően elküldtük szekvenálásra (UD-GenoMed kft, Debrecen), majd a kapott nyers adatokat bioinformatikai analízisnek vetettük alá.

3.9.1 A kis RNS könyvtárak bioinformatikai analízise

A megszekvenált kis RNS könyvtárak minőségét FastQC programmal (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>), ellenőriztük melynek során megvizsgáltuk, hogy mennyi adapter szekvenciát tartalmaznak a leolvasások, illetve leellenőriztük a hosszúságukat. Az adapterek eltávolítását követően (Cutadapt 1.2.1, (Martin, 2011)) megszűrtük a 16-28 nukleotid hosszúságú leolvasásokat. Az alacsony abundanciájú (<3), illetve a transzfer- és riboszómális RNS eredetű szekvenciákat eltávolítottuk (Python scripts, Rfam adatbázis, (Nawrocki et al., 2014)). Ahhoz, hogy a leolvasásokból prediktálhassunk miRNS-eket elsőként a kapott szekvenciákat illesztettük a búza genomra Bowtie program segítségével (Langmead et al., 2009). Azért, hogy megtudhassuk, hogy az adott kis RNS egy miRNS prekuzorról jön-e létre vagy sem, a kis RNS-ek szekvenciáit 5'- és -3' irányba 250-250 nukleotid hosszúságra kiterjesztettük a búza genomon, majd ViennaRNA Package program (Lorenz et al., 2011) segítségével prediktáltuk azok másodlagos RNS szerkezetét. Ezt követően miRDeep-P (Yang és Li, 2011) program segítségével, mely tartalmazza a növényi miRNS-ek prekuzorainak kritériumait (Meyers et al., 2008), kiválogattuk a potenciális pre-miRNS-eket. Majd a program által prediktált miRNS-ek közül kiszűrtük miRBase Release 21 adatbázison (Kozomara és Griffiths-Jones, 2014) keresztül a már ismert és a potenciónalisán új miRNS-eket. Az egyes kis RNS leolvasásokat az alábbi képletekkel normalizáltuk: leolvasás száma/összes nyers leolvasások száma $\times 10^6$ vagy leolvasás száma/összes szűrt leolvasások száma $\times 10^6$.

A búza kis RNS könyvtárak bioinformatikai elemzésének döntő hányadát Nagy Tibor kollégánk végezte el.

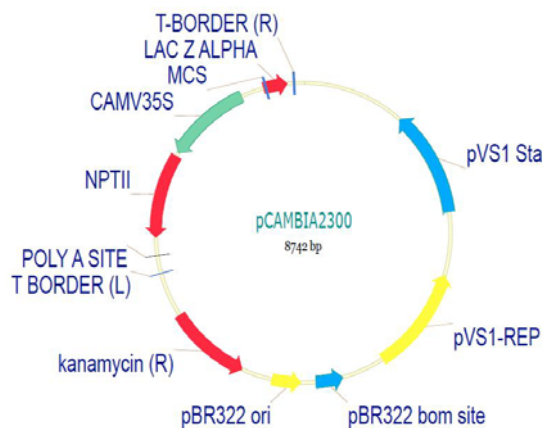
4. EREDMÉNYEK

4.1 Vírusrezisztencia kialakítása árpában mesterséges miRNS technológiával

4.1.1 A felhasznált vektorok létrehozása

4.1.1.1 A miRNS expressziós vektor előállítás

A miRNS-ek és az amiRNS-ek növényben való expresszáltatására alkalmas vektort (pC61K) pCambia2300 (CAMBIA, Canberra, Ausztrália) plazmid (7. ábra) felhasználásával hoztuk létre. A plazmidba HindIII-EcoRI restrikciós hasítás segítségével klónoztuk be a karfiolmozaik vírus 35S promóterét és terminátorát, melyet az említett enzimek segítségével BIN61S vektorból (Silhavy et al., 2002) emésztettünk ki. Az internetes miRBase adatbázis (Kozomara és Griffiths-Jones, 2014) felhasználásával kerestünk potenciális pri-miRNS-eket, melyeket a szerkezetük alapján választottunk ki, preferálva az egyszerűbb szerkezetű és egyszerűbben átalakítható prekursorokat. Az árpa *hvu-MIR171*-es (miRBase accession number: MI0016461; NCBI accession number: JX195502), a *hvu-MIR159a* (miRBase accession number:; NCBI accession number: BJ448559) és a *hvu-MIR397a* (miRBase accession number:; NCBI accession number: FD518508) prekursorát Golden promise árpafajtából izoláltuk.



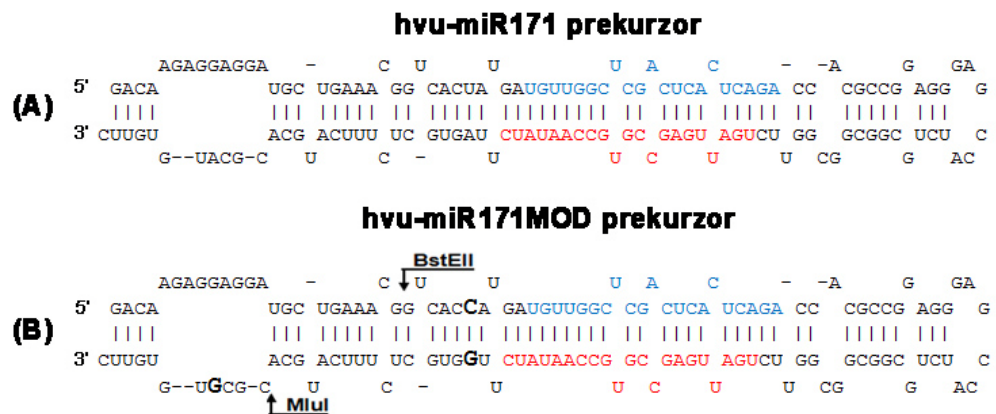
7. ábra: A pCambia2300 bináris vektor térképe

Az NCBI adatbázisban található szekvenciák alapján tervezett oligópárokkal egy 138 nukleotid hosszú (*hvu-MIR171*), egy 387 nukleotid hosszú (*hvu-MIR159a*) és egy 271 nukleotid hosszú (*hvu-MIR397*) PCR terméket amplifikáltunk, melyet az oligókon elhelyezett restrikciós hasítóhelyek (KpnI-XbaI) segítségével pC61K

expressziós vektorba klónoztunk. A felhasznált oligók szekvenciáit az 1. sz. Melléklet tartalmazza.

4.1.1.2 A hvu-MIR171MOD vektor előállítás

Annak érdekében, hogy a hvu-MIR171-es prekurzort a későbbiekben egyszerűbben át tudjuk alakítani PCR mutagenézis segítségével, a pC61Khvu-miR171 vektorra nézve egyedi hasítóhelyeket generáltunk a hvu-miR171-es prekurzorba, a miRNS és a miRNS* szál közelében (8. ábra). A mutációk létrehozásakor fokozottan figyeltünk rá, hogy a prekurzor másodlagos szerkezete ne változzon. A PCR reakcióban a hvu-MIR171MODF oligó egy BstEII, a hvu-MIR171MODR oligó pedig egy MluI restriktós helyet generált a prekurzoron. A módosított prekurzort szintén pC61K plazmidba klónoztuk. A vektort pC61Khvu-miR171MOD-nak neveztük el.



8. ábra: Az árpa hvu-miR171-es prekurzorának átalakítása. (A) vad típusú prekurzor; (B) módosított prekurzor: PCR-mutagenézissel egyedi hasítóhelyek generálása a másodlagos szerkezet megtartásával; *Félkövér betűk:* a módosított nukleotidokat jelölik, a *nyilak* a kialakított restriktós felismerő helyeket, a *piros betűk* a 171-es miRNS-t emelik ki, a *kék betűk* pedig a 171-es miRNS csillag szálát.

4.1.1.3 Az amiRNS-ek célszekvenciáinak kiválasztása

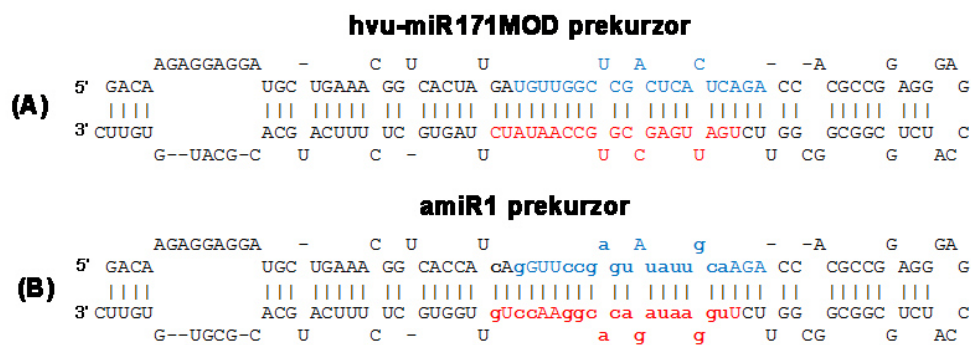
Az amiRNS vektorok létrehozásának szempontjait a 2.5.3-as alfejezetben már ismerttettem. Mindezek figyelembe vételével a WDV h07-es törzs szekvenciája (NCBI: FM210034) alapján kiszűrtük a lehetséges amiRNS célhelyeket a vírus replikáz és mozgási fehérje génjeire. Az előbbi esetében 136, az utóbbi esetében 31 db, a szempontoknak megfelelő célszekvenciát tudtunk kijelölni. Az amiRNS-eket teljes komplementaritással terveztük a célszekvenciákra. Ezt követően megvizsgáltuk az amiRNS-ek nem kívánt hatásait (OFF-target) az árpa transzkriptomra vonatkozóan egy internetes alkalmazás segítségével (Dai és Zhao, 2011). A szűrés

eredményeként mindössze 15 db OFF-target-mentes amiRNS maradt a *replikáz* génre és 8 db a *mozgási fehérje* génre.

Ezeket az OFF-target-mentes amiRNS-eket szekvencia összehasonlításnak vetettük alá a WDV árpa és búza törzseivel (5-5 db) és kiválasztottunk 8 db-ot a *replikáz*, 2 db-ot pedig a *mozgási fehérje* génekre, amelyek a 2.5.3-as alfejezetben leírt szempontok figyelembe vételével hatékonyak lehetnek mind az árpa mind a búza WDV törzsekre. Amennyiben ez a feltétel nem teljesült minden esetben, akkor a WDV-h07-es árpa törzsre alkalmas amiRNS-t választottunk. A szekvencia összehasonlító elemzést a kiválasztott 10 amiRNS-sel a 4. sz. Melléklet tartalmazza.

4.1.1.4 Az amiRNS prekursorok létrehozása

Az amiRNS prekursorokat PCR-mutagenézissel hoztuk létre, templátként használva a pC61Khvu-miR171MOD vektort. A tervezés során első körben a 171-es miRNS helyére beillesztettük az adott amiRNS szekvenciát, majd a vele szemben elhelyezkedő miR171* szál szekvenciáját úgy módosítottuk, hogy a prekursor másodlagos szerkezet megegyezzen az eredetivel (9. ábra). A reakcióhoz tervezett PCR oligók (1. sz. Melléklet) az eredeti hvu-miR171 miRNS helyén tartalmazták a WDV vírusra specifikus amiRNS-eket (amiR1-10F) és azok komplementer (csillag) szálát (amiR1-10R).



9. ábra: A hvu-miR171 prekursor átalakítása amiRNS prekursorra a másodlagos szerkezet megtartásával. (A) vad típusú prekursor; (B) átalakított amiRNS prekursor; *kis, félkövér betűk*: a módosított nukleotidokat, a *pirossal* szedett betűk az eredeti 171 miRNS pozícióját, a *kékkel* szedett betűk az eredeti 171 miRNS* szál pozícióját jelölik.

A reakciót követően a 110 nukleotid hosszú PCR termékeket BstEII-MluI restrikciós enzimek segítségével pC61Khvu-miR171MOD vektorba klónoztuk.

4.1.1.5 GFP-szenzor konstrukciók

A mesterséges miRNS-ek biológiai aktivitásának letesztelésére GFP szenzor konstrukciókat hoztunk létre. E célra a pBIN61GFP vektort használtuk fel, ami az *mgfp5* gént tartalmazza egy karfiolmozaik vírus 35S kazettában. A gén 3' nem transzlálódó, de átíródó régiójába helyeztük el az amiRNS-ek célszekvenciáit ötösével (13. ábra/B). A két szenzor konstrukció létrehozásához két-két 59 nukleotid hosszúságú oligót rendelünk (amiR1-5targetF és R, amiR6-10targetF és R), melyek részben (13 nukleotid) komplementerek voltak egymással. Az oligókat polinukleotid kináz (PNK - Fermentas) segítségével foszforiláltuk, majd PCR reakcióban létrehoztuk a duplaszálú DNS inszertet, melyet a XbaI-vel megkasított, majd T4 DNS polimerázzal (Fermentas) (tompá végűre) feltöltött pBIN61GFP plazmidba klónoztunk. Az inszert helyes orientációját PCR reakcióval ellenőriztük. A vektorokat pGFPamiR1-5 és pGFPamiR6-10-nek neveztük el.

4.1.1.6 Policisztronikus amiRNS expressziós vektorok

A három kiválasztott amiRNS prekuzort közvetlenül egymás után rendezve (amiR1-amiR6-amiR8) megszintetizáltattuk (GeneArt®, Life Technologies) 5'-BamHI és 3'-KpnI-PstI restrikciós hasítóhelyekkel ellátva, melyet VirusBuster171-nek neveztünk el. Ezt követően a konstrukciót BamHI-PstI hasítóhelyekkel áthelyeztük pC61K vektorba létrehozva ezzel a pC61KVirusBuster171 névre keresztelt konstrukciót.

Az egyszikűek transzformálására alkalmas konstrukciót pCambia1300 (CAMBIA, Canberra, Australia) plazmid felhasználásával hoztuk létre. Az alap vektorba először HindIII-BamHI enzimek használatával elhelyeztük az *Ubi1* kukorica polyubiquitin gén promóterét, amelyet szintén HindIII-BamHI enzimekkel emésztettünk ki pAHC25 (Christensen és Quail, 1996) plazmidból. Ezt követően NOSF és NOSR primerek használatával felszaporítottuk az *Agrobacterium tumefaciens nopalín szintáz* (NOS) génjének terminátorát, melyet az oligókon elhelyezett hasítóhelyek (KpnI-SacI) alkalmazásával a pCubi vektorba klónoztunk, létrehozva ezzel a pCubiNOS transzformációs vektort. Később ebbe a vektorba helyeztük el BamHI-KpnI enzimek segítségével a leszintetizáltatott policisztronikus amiRNS konstrukciót (pCubiVirusBuster171).

4.1.1.7 *Agrobacterium*-közvetített WDV fertőző konstrukció

Az *Agrobacterium*-közvetített WDV fertőzést egy bináris vektor felhasználásával hoztuk létre. A konstrukciót a geminivírus WDV-H07-es izolátumából (NCBI accession number: FM210034) állítottuk elő egy, az irodalomban már leírt módszer alapján (Ramsell et al., 2009). A pPZP201 bináris vektorba (NCBI accession number: U10489) első körben egy HindIII-BamHI-es emésztést követően elhelyeztük a WDV genom felét (1376 nukleotid) virion-szensz orientációban. Ezt követően azonos orientációban egy HindIII-as hasítással beklónoztuk a vektorba a teljes WDV vírust (2734 nukleotid) létrehozva ezzel a pPZP201WDV1,5MER vektort, amiből a növényi sejtmagban homológ rekombinációval képes kialakulni a cirkuláris, teljes genomú duplaszálú vírus.

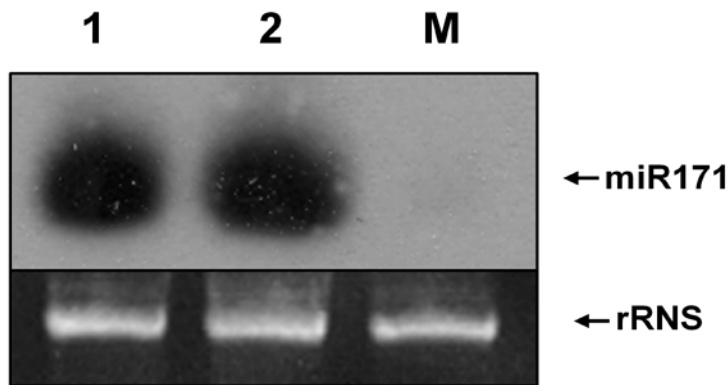
4.1.1.8 WDV replikáz fehérjét expresszáló konstrukció

A WDV replikáz fehérjét (mint RNS-interferencia szupresszort) expresszáló konstrukciót BIN61S (Silhavy et al., 2002) vektorban hoztuk létre. A WDVrepF és a WDVrepR oligókkal felszaporítottuk a WDV-H07-es klón *replikáz* génjét, melyet XbaI-SalI restriktív enzimek segítségével klónoztuk be a BIN61S vektorban található karfiolmozaik vírus 35S expressziós kazettába. A vektort pRep-nek neveztük el.

4.1.2 Árpa miRNS prekursorok tesztelése tranziens rendszerben

Az árpa prekursorokat (10. ábra/A) a miRBase (www.mirbase.org) adatbázisból választottuk ki. Az adatbázisban prediktált másodlagos szerkezetek alapján azokat a prekursorokat választottuk ki, amiket az átalakítás szempontjából előnyösebbnek találtunk.

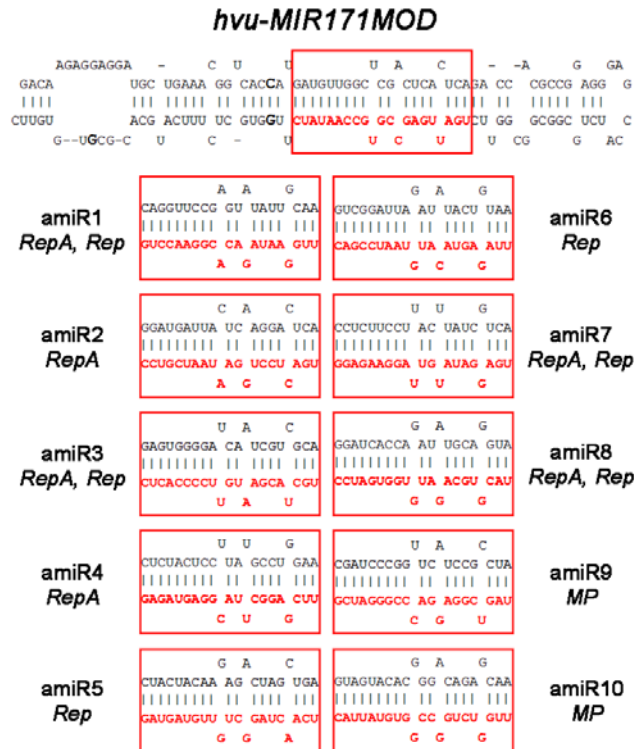
A három, árpából izolált prekuzorról (hvu-miR159, hvu-miR171, hvu-miR397) történő miRNS érést dohány növényben (*Nicotiana benthamiana*) vizsgáltuk. A pC61K miRNS expressziós vektorba klónozott prekuzorokról az agroinfiltrációt követően megközelítően azonos mennyiségű pre-miRNS-nek kellett átíródnia a dohány sejtekben, mivel őket azonos promotérral (35S) hajtottuk meg. Az ezt követő northern hibridizáció segítségével pedig a prekuzorokról érő miRNS-ek mennyiségét tudtuk detektálni (10. ábra/B). A 159-es miRNS esetében magas miRNS expressziót mutattunk ki, ugyanakkor a 21 nukleotidos (nt) mérettől eltérő tartományban (22-24) is kaptunk kis RNS-t.



11. ábra: mir171-es mikro RNS northern hibridizációja. *1*: vad típusú hvu-miR171 prekurzorral; *2*: hvu-miR171MOD prekurzorral történt infiltráció; *M*: infiltrált 'Mock' kontroll; *rRNS* – etidium bromiddal festett riboszómális RNS, mint mintafelviteli kontroll

4.1.4 A mesterséges miRNS-ek (amiRNS) létrehozása

A korábban jellemzett feltételek alapján a referencia genomként használt WDV-h07-es törzs *replikáz* génjéről összesen 136 db potenciális célszekvenciát szűrtünk ki. Mindezek közül árpa növényben csupán 18 darab bizonyult OFF-target-mentesnek a rendelkezésre álló bioinformatikai adatbázisok (Dai és Zhao, 2011) alapján. A *mozgási fehérje* génre (MP) tervezett 31 amiRNS közül pedig csak nyolcnak nem volt más célszekvenciája árpában. A potenciális amiRNS-ek célszekvenciáit összehasonlítottuk 5-5 darab WDV árpa és búza törzs szekvenciájával (4. sz. Melléklet). Mindezek közül kiválasztottunk a *replikáz* génre tervezett amiRNS-ek közül nyolcat, a *mozgási fehérje* génre tervezettek közül pedig kettőt (12. ábra). Az amiRNS-eket teljes komplementaritással terveztük a referencia genomra, ugyanakkor a kiválasztott, OFF-target-mentes amiRNS-ek közül nem mindegyik esett konzervatív szekvenciákra a többi vizsgált WDV törzs tekintetében. Ezért a kiválasztásnál a miRNS-célszekvencia kapcsolatban fontos bázispárosodási kritériumokat (2.5.3 fejezet) vettük figyelembe, hogy ezek által a kiválasztott amiRNS-ek hatékonyak legyenek a WDV búza és árpa törzseire egyaránt.

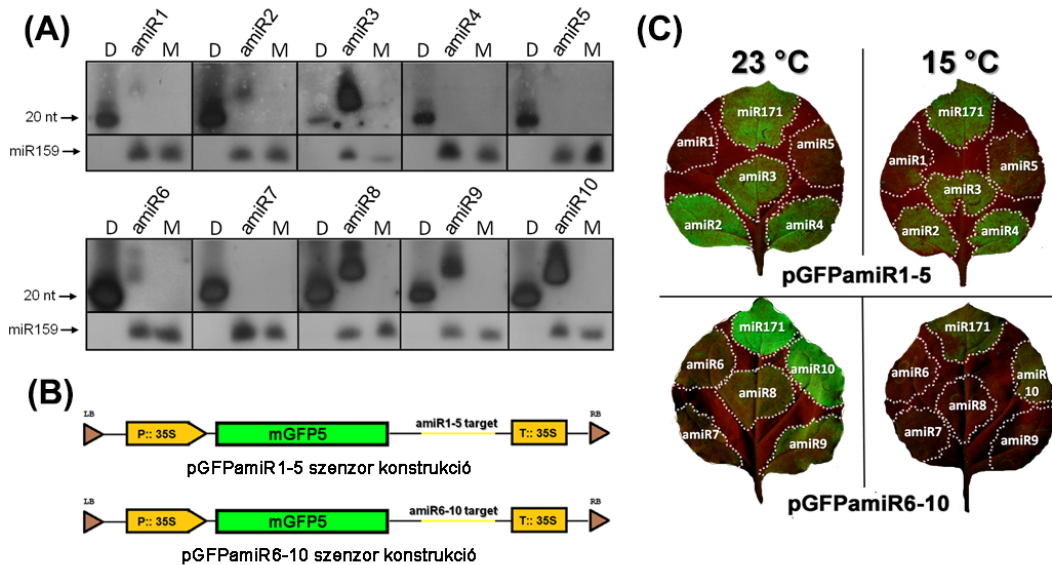


12. ábra: A kiválasztott amiRNS-ek és prediktált másodlagos szerkezetük a *hvu-MIR171MOD* prekurzorba. *Rep, RepA* – replikáz gének; *MP* – mozgási fehérje gén

4.1.4.1 Az amiRNS-ek validálása és tesztelésük tranziens rendszerben

Az amiRNS prekurzorokat tartalmazó vektorokat (amiR1-10) *Agrobacterium*-ba klónoztuk, majd dohánylevél agroinfiltrációt követően northern hibridizációval megvizsgáltuk a mesterséges miRNS prekurzorokról történő amiRNS érést. A 10-ből 7 esetben tudtunk kimutatni amiRNS felhalmozódást, 3 esetben (amiR4, amiR5, amiR7) viszont nem sikerült detektálnunk (13. ábra/A).

Ezt követően szeretnénk volna meggyőződni arról, hogy a létrehozott amiRNS-ek biológiailag aktívak-e: képesek-e beépülni a RISC-be és degradálni a velük komplementer szekvenciát tartalmazó RNS-eket? Ennek vizsgálatára létre hoztuk két GFP-szenzor konstrukciót, amik a GFP gén 3' nem kódoló régiójában egyenként 5-5 db amiRNS célszekvenciát tartalmaztak (13. ábra/B). Ezáltal a konstrukciókról átíródó GFP RNS-t szenzitívvé tettük a létrehozott amiRNS-ekre, amik hatását UV-fényben vizuálisan is jól meg tudjuk vizsgálni. A szenzorokat először 23 °C-on expresszáztattuk együtt az amiRNS-eket egyenként tartalmazó konstrukciókkal dohány növények levelében, majd mivel fontos, hogy a rendszer alacsony hőmérsékleten is működőképes és hatékony legyen, a kísérletet elvégeztük 15 °C-on is (13. ábra/C). Az agroinfiltrációkat 2-2 ismétlésben készítettük el.



13. ábra: Mesterséges miRNS-ek (amiRNS) validálása és biológiai aktivitásának vizsgálása. (A) amiRNS northern hibridizáció eredménye, *D* – Decade™ Marker RNA (Ambion), *M*: infiltrált 'Mock' kontroll; *nt* – nukleotid; *miR159* – mintafelviteli kontroll (B) GFP-szenzor konstrukciók sematikus ábrája, *amiR1-5 target* – az amiRNS-ek célszekvenciái ötösével; (C) amiRNS-ek biológiai aktivitás vizsgálása dohánylevél agroinfiltrációval két hőmérsékleten

Mindkét hőmérsékleten azonos eredményt kaptunk, de több meglepő dolgot is tapasztaltunk: olyan amiRNS-ek is le tudták csendesíteni a specifikus GFP-szenzor RNS-üket, amelyeket nem tudtunk northern hibridizációval detektálni (amiR5, amiR7); más részről több amiRNS, aminek jelenlétét ki tudtuk mutatni northern hibridizációval (amiR2, amiR3, amiR10), nem volt képes gátolni a GFP expressziót. A működő amiRNS-ek 15 °C-on is hasonló intenzitással csökkentik a GFP-szenzor expressziót, amiből arra következtethetünk, hogy az amiRNS-ek valóban a miRNS útvonalon jönnek létre és nem a siRNS útvonalon.

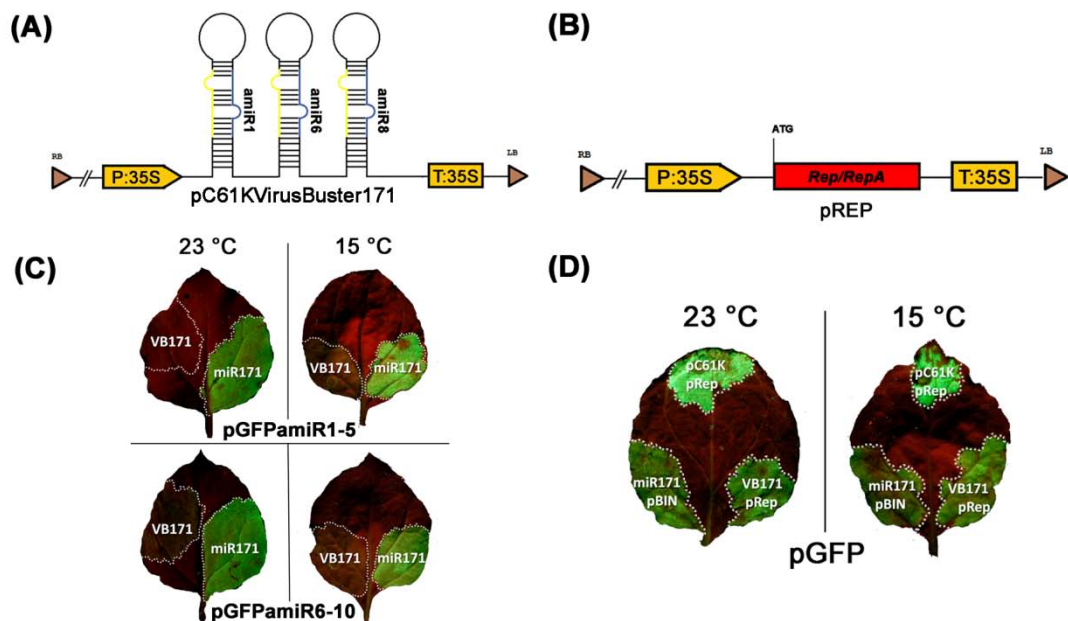
4.1.4.2 A policisztronikus amiRNS konstrukció biológiai aktivitás vizsgálása

A policisztronikus amiRNS konstrukcióhoz olyan amiRNS-eket választottunk, amiket képesek voltunk northern hibridizációval kimutatni a tranziens tesztekben; biológiailag aktívnak bizonyultak a GFP-szenzor vizsgálatok során; illetve a szekvencia illesztések alapján valamennyi WDV genomra működőképesek lehetnek.

Úgy döntöttünk, hogy az egyetlen működő *mozgási fehérje* (MP) génre tervezett amiRNS-t nem választjuk ki, mert hatékonyabbnak gondoltuk, ha a vírusnak egy egységét, egy génjét támadjuk több amiRNS-sel, így is csökkentve a vírus mutációval történő rezisztencia törésének lehetőségét. Ezért a biológiai tesztekben a három leghatékonyabbnak bizonyult amiRNS-t választottuk ki (amiR1,

amiR6, amiR8). Ezeket közvetlen egymásután rendezve (pC61KVirusBuster171 vektorban, 14. ábra/A) expresszáztattuk a két GFP-szenzor konstrukcióval dohány növények leveleibe. Hasonlóan az amiRNS-eket egyenként vizsgáló kísérlethez (13. ábra/C), mindkét szenzor konstrukció és mindkét hőmérséklet esetében jelentős GFP jelcsökkenést tapasztaltunk az UV-fényben vizsgált infiltrált leveleknél (14. ábra/C).

Az amiRNS-ek biológiai aktivitását megvizsgáltuk közvetlenül a replikáz génre is. Mivel időközben leírták (Liu et al., 2014), hogy a gén egyben RNS interferencia szupresszor is, lehetőségünk nyílt arra, hogy felépítsünk egy másik GFP alapú riporter rendszert, ahol meg tudjuk vizsgálni a policisztronikus amiRNS konstrukció hatását közvetlenül a replikáz RNS-re. Az agroinfiltráció során átíródó idegen RNS-t a sejt – annak nagy mennyisége, vagy 'aberráns' mivolta miatt – egy idő után elkezdheti eltávolítani az RNS interferencia siRNS útvonalán keresztül. Tehát, ha képesek vagyunk megkötni a sejt által generált GFP-specifikus siRNS-eket, akkor sokkal nagyobb mértékű GFP expressziót kell kimutatnunk, mivel sokkal több intakt GFP RNS marad a sejtben.



14. ábra: A policisztronikus amiRNS konstrukció biológiai aktivitásának tesztelése. (A) pC61KVirusBuster171 konstrukció sematikus ábrája; (B) WDV replikáz gént, mint RNS interferencia szupresszort expresszáló konstrukció (*pRep*); (C) pC61KVirusBuster171 (*VB171*) konstrukció koexpresszáztatva a két GFP-szenzor konstrukcióval, *miR171* – negatív kontroll; (D) pC61KVirusBuster171 (*VB171*) konstrukció koexpresszáztatva a WDV replikáz (*pRep*) és vad típusú GFP-t expresszáló konstrukcióval (*pGFP*), *miR171*, *pC61K* és *pBIN* – mint negatív kontroll üres vektorok

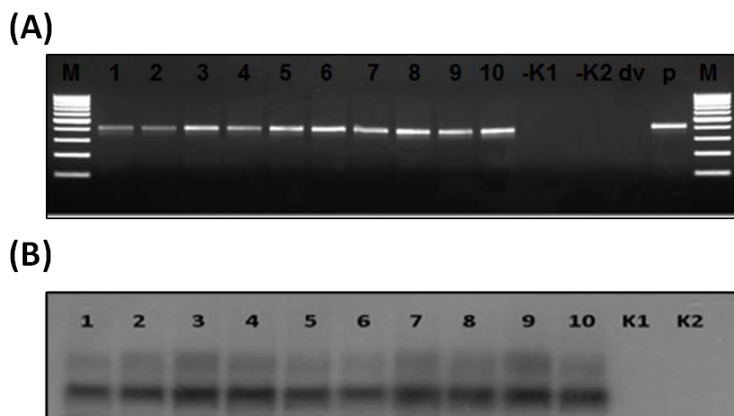
Tudván azt, hogy a WDV replikáz fehérje, mint RNS-interferencia szupresszor, a saját védelme érdekében képes megkötni a növényi sejt által gyártott siRNS-eket

(Liu et al., 2014), feltehetően képes megkötni a GFP-specifikus siRNS-eket is. Ha tehát egyszerre expresszáltatjuk a vad típusú GFP fehérjét a WDV replikáz jelenlétében, szignifikánsan magasabb GFP fluoreszcenciát kell tapasztalnunk, mint nélküle. A hipotézisünket kísérletesen bizonyítottuk (14. ábra/D) és azt tapasztaltuk, hogy valóban megnőtt a GFP fluoreszcencia intenzitása a replikáz fehérje jelenlétében (pC61K és pRep + pGFP). Amikor a rendszerhez hozzáadtuk a policisztronikus amiRNS konstrukciót (VB171 és pRep + pGFP) a GFP jelintenzitása a kontroll (miR171 és pBIN + pGFP) szintjére csökkent. Mindebből arra következtettünk, hogy az előállított amiRNS-ek nem csak a GFP-szenzor RNS-t, hanem az intakt WDV replikáz RNS-t is képesek degradálni.

4.1.5 WDV fertőzött árpa növények előállítása

A WDV fertőzés esetében mindenképp fontosnak tartottuk, hogy a módszer megbízható és megismételhető legyen. Mivel nem tudhatjuk, hogy a természetből begyűjtött rovarvektorok pontosan milyen és mekkora mennyiségű WDV törzset hordoznak, ezért felállítottunk egy mesterséges vírusfertőzési rendszert.

A WDV-h07-es árpatorzsból megépítettük az *Agrobacterium*-mal közvetetten árpát fertőzni képes pPZP201WDV1,5MER „agrofertőző” konstrukciót, majd annak segítségével elvégeztük a WDV fertőzést. A kezelést követően az inokulált magok 80%-a kelt ki. Az ötödik héten tíz kiválasztott tünetes egyeden elvégeztük a molekuláris analízist a WDV vírus jelenlétére vonatkozóan (15. ábra).



15. ábra: A WDV fertőzött növények molekuláris analízise. (A) WDV replikáz specifikus PCR reakció, *M* – GeneRuler 100 bp marker; *1-10* – fertőzött minták; *-K1*, *-K2* – fertőzetlen kontroll növények; *dv* – desztillált víz kontroll; *p* – plazmid kontroll **(B)** WDV replikáz specifikus northern hibridizáció, *1-10* – fertőzött minták; *K1*, *K2* – fertőzetlen kontroll növények

A vírus DNS jelenlétét a *replikáz* génre tervezett oligó párok segítségével PCR-rel (15. ábra/A), illetve az arról átíródó RNS-t northern hibridizációval (15. ábra/B) a növények mindegyikéből sikerült kimutatni.

4.1.6 Árpa transzformáció policisztronikus amiRNS konstrukcióval

Az *Agrobacterium*-közvetítette éretlen embrióra alapozott árpa transzformáció során a policisztronikus amiRNS konstrukciót (16. ábra/A) tartalmazó *Agrobacterium*-mal 365 db éretlen embriót fertőztünk meg. Összesen 77 db hygromicin génre PCR pozitív egyedet tudtunk regenerálni 20 különböző kalluszból. Az egy kalluszból nevelkedett növényeket azonos vonalként tartottuk számon. Így a transzformáció hatékonysága 5,5%, ami a szakirodalom alapján elfogadható arány.

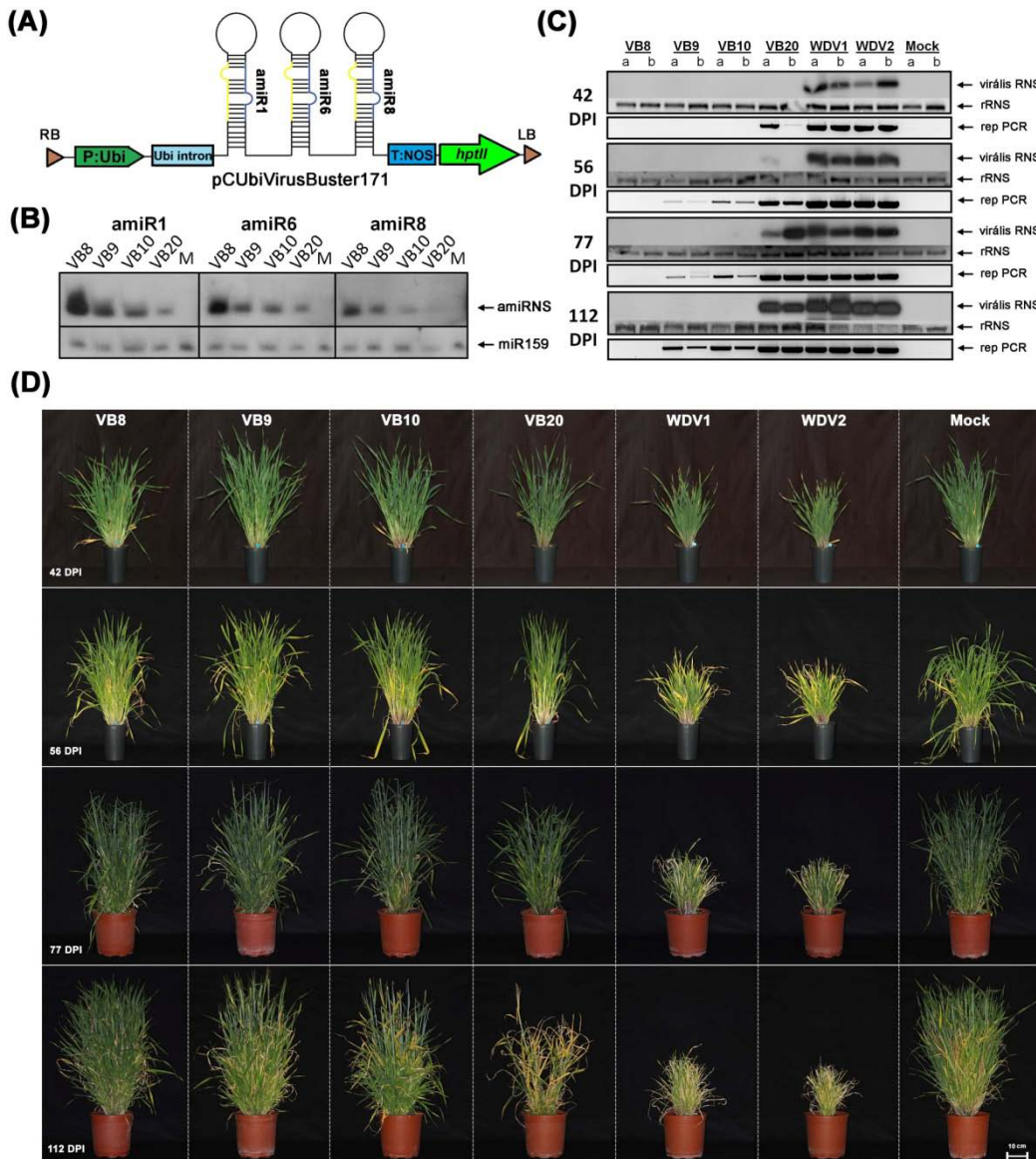
A transzgénikus vonalakban termeltetett amiRNS-ek kimutatásával eleinte gondjaink akadtak. A laborunkban használt kis RNS northern hibridizációs technikával nem tudtuk detektálni az árpában kialakuló amiRNS-eket, feltehetően azért, mivel azok abundanciája nagyságrendekkel kisebb az agroinfiltráció során a dohány levelében keletkezőkétől. Ezért a későbbiekben új technikával kötöttük az RNS-eket a membránra (kémiai cross-link), illetve az amiRNS-ek detektálása során gyári hibridizációs folyadékot (ULTRAHyb-Oligo buffer, Ambion) alkalmaztunk. A két módosítást követően már sikeresen ki tudtuk mutatni az amiRNS-eket a növényekből.

4.1.6.1 Transzgénikus árpa vonalak tesztelése WDV fertőzéssel

Négy vonalat választottunk ki, amik különböző mértékben expresszálták az amiRNS-eket (16. ábra/B). A VB8-as vonal relatív magas expresszióval rendelkezett, a VB9 és VB10-es vonal közepessel és végül a VB20-as vonal, ami a többiekhez képest jóval kevesebb amiRNS-t tartalmazott. A különböző expressziós mintázat feltehetően a transzgén kópiaszámának tudható be az egyes vonalaknál, amit kísérletesen ugyan nem igazoltunk.

A növényeket kabóca vektorok segítségével fertőztük meg a WDV-h07-es törzssel. Az *Agrobacterium*-közvetítette WDV fertőzött növényekre helyeztük el a több generáción át nevelt kabóca vektorokat, majd az állatokat mikroizolátorokba raktuk, amiket a transzgénikus vonalainkra helyeztünk. A növénynevelés hőmérsékletét (12-15 °C) úgy állítottuk be, hogy a növény endogén, RNS interferencián alapuló (siRNS) védekező rendszere gátolva legyen, előidézve ezzel a

szántóföldön kora ősszel jelentkező klimatikus viszonyokat. Az egy hetes fertőzési időszakot követően a kabócákból PCR-rel kimutattuk a WDV DNS-t (5. sz. Melléklet), majd négy időpontban (42, 56, 77, 112 nappal fertőzés után (day post inoculation – DPI)) molekuláris eszközökkel megvizsgáltuk a WDV jelenlétét a növényekben is (16. ábra/C). Mind a PCR alapú, mind a northern hibridizációs



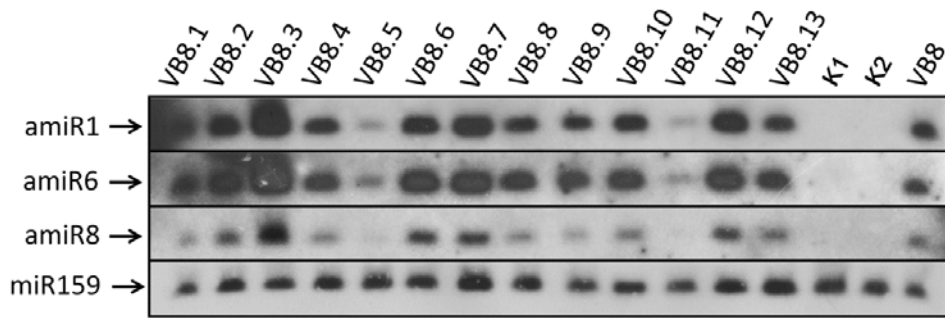
16. ábra: A policisztronikus amiRNS konstrukció tesztelése árpában.

(A) a policisztronikus amiRNS konstrukció; *Ubi* – kukorica *ubiquitin* promóter; *NOS* – *nopaline* szintáz terminátor; *hptII* – *hygromicin* szelekciós markergén; (B) négy árpavonal amiRNS northern hibridizációja; *miR159* – mintafelviteli kontroll; (C) a kiválasztott vonalak (VB8, VB9, VB10, VB20) molekuláris analízise a fertőzést követően; *WDV1*, *WDV2* – fertőzött vad típusú növények; 'Mock' – nem fertőzött vad típusú kontroll; *a* – fiatal levél minta, *b* – idősebb levél minta; virális RNS – northern hibridizáció; *rRNS* – riboszómális RNS, mint mintafelviteli kontroll, *DPI* – day post inoculation (fertőzéstől eltelt napok száma) (D) a fertőzött növények fenotípusa a vizsgált időpontokban.

vírusdiagnosztika eredménye bizonyítja, hogy a WDV specifikus amiRNS-ek hatással vannak a vírus szaporodására. Míg az első időpontban (42 DPI) a kontroll fertőzött növények esetében meglehetősen magas WDV replikáz szintet tudunk detektálni RNS szinten is, addig a transzgenikus vonalak esetében a vírus jelenlétét csak a VB20-as vonalnál sikerült PCR-rel kimutatni, ami egyébként fenotípusát tekintve (16. ábra/D) inkább hasonlított a fertőzetlen kontroll növényre (Mock), mint a fertőzöttekre (WDV1, WDV2). A későbbi időpontokban (56, 77, 112 DPI) már a *replikáz* RNS is kimutatható volt a növényben, amit a növény fenotípusa is erősen tükrözött. A VB9-es és VB10-es vonal, amik megközelítően egyenlő mértékben expresszálták az amiRNS-eket, a vírusfertőzésre is hasonlóan reagáltak. Habár 56 nappal a fertőzést követően már PCR technikával kimutatható volt bennük a WDV, ennek ellenére a northern hibridizáció még 112 nappal (kalászos állapot) a fertőzést követően sem volt képes kimutatni a *replikáz* RNS-t. A VB8-as vonal, ami a VB9-es és VB10-es vonalakhoz képest megközelítően dupla akkora amiRNS expressziót produkált, teljes rezisztenciát mutatott a WDV fertőzésre. A teljes vegetációs időszak alatt sem a vírus DNS-t, sem a vírus replikáz RNS-t nem tudtuk kimutatni a növényből. A növény, fenotípusát tekintve teljes mértékben megegyezett a vad típusú fertőzetlen kontrolléval (16. ábra/D). A VB9-es és VB10-es növények az első 2-3 kalászatukat képesek voltak kinevelni, de az újonnan jövő kalászok a megnövekedett vírus szint miatt már nem értek be, vagy a magok nem telítődtek ki megfelelően.

4.1.6.2 T1 utódgeneráció molekuláris vizsgálata

A VB8-as vonal utódai közül 13 egyedben megvizsgáltuk az amiRNS expressziót kis RNS northern hibridizáció segítségével (17. ábra). Minden egyednél sikerült detektálnunk a három amiRNS-t, ugyanakkor hasadó populációról lévén szó, különböző mértékű expressziót tapasztaltunk az utódoknál. Az eredményekből nagyon jól látszik, hogy a VB8-as vonal esetében több transzgen kópiáról beszélhetünk, amelyek az öntermékenyítés következtében feltehetően homozigóta formába kerülve még magasabb expressziót produkáltak a szülő vonalhoz képest (17. ábra; VB8.2, 3, 6, 7, 12), de akadt az utódok között olyan is, amely a szülő vonaltól kisebb mértékű amiRNS expressziót mutatott (17. ábra; VB8.5, 11).



17. ábra: VB8-as vonal utódgenerációjánál végzett kis RNS northern hibridizáció eredménye. VB8.1-13 – T1 transzgenikus utódgeneráció; K1, K2 – vad típusú kontroll növények; VB8 – T0 transzgenikus növény; amiR1, 6, 8 – a három expresszálatott amiRNS northern hibridizációja radioaktívan jelölt, specifikus DNS oligóval; miR159 – miRNS hibridizáció, mint mintafelviteli kontroll

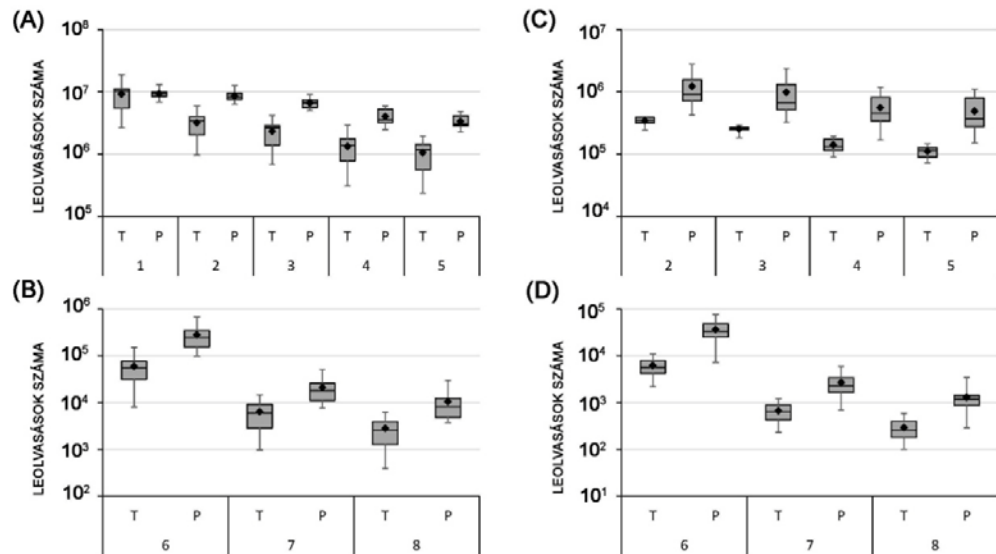
4.2 Új búza miRNS azonosítása amiRNS-ként történő felhasználásra

4.2.1 Búza kis RNS könyvtárak készítése

Összesen 18 db kis RNS könyvtárat állítottunk elő fejlődésben lévő (10-20-30 napos) búzamagokból (*T. aestivum* Bánkúti B35 és B52 és *T. spelta*) két biológiai ismétléssel. A könyvtárat gélből visszaizolált kis RNS frakciót felhasználva (P könyvtárak) laborunkban készítettük el, ezekkel párhuzamosan a szekvenálást végző UD-Genomed (Debrecen) cég is létrehozta ugyanabból az RNS mintákból a könyvtárat visszaizolálás nélkül (T könyvtárak) szintén Illumina kit felhasználásával. Mindent egybevetve összesen 36 könyvtárat szekvenáltattunk meg, amiket a két eljárás tekintetében minőségi jellemzésnek vetettünk alá.

A totál RNS-ből (T) illetve a visszaizolált kis RNS-ből (P) készített könyvtárak a teljes leolvasások számának tekintetében nem mutattak nagy eltérést a szekvenálások során (átlagosan: 9,192,098 (T), 9,244,612 (P) leolvasás). Az adatok variabilitását tekintve már nagyobb különbségeket tapasztaltunk a két módszerrel létrehozott könyvtáraknál, mind a nyers adatokat tekintve (18. ábra/A, B), mind a normalizálást követően (18. ábra/C, D). Az adapterek, a transzfer- és a riboszómális RNS-ek eltávolítását, a méretszelekciót és az alacsony abundanciájú leolvasások eltávolítását követően ~30%-kal több leolvasást kaptunk „P” könyvtárak esetében (6. sz. Melléklet; 18. ábra/A4 és C/4). A miRBase adatbázisra történő illesztésnél is lényegesen több leolvasást kaptunk a már ismert miRNS-ek esetében (6. sz. Melléklet). A T könyvtáraknál 1934 egyedi, potenciális miRNS szekvencia illett fel a búza genomra, a P könyvtárak esetében ez a szám 3247 volt. A két könyvtársorozatot egybevéve összesen 3338 egyedi kis RNS szekvenciát azonosítottunk, melyekből 69 db egyezett 100%-osan a miRBase adatbázisban található miRNS-ekkel. Ezekből 28

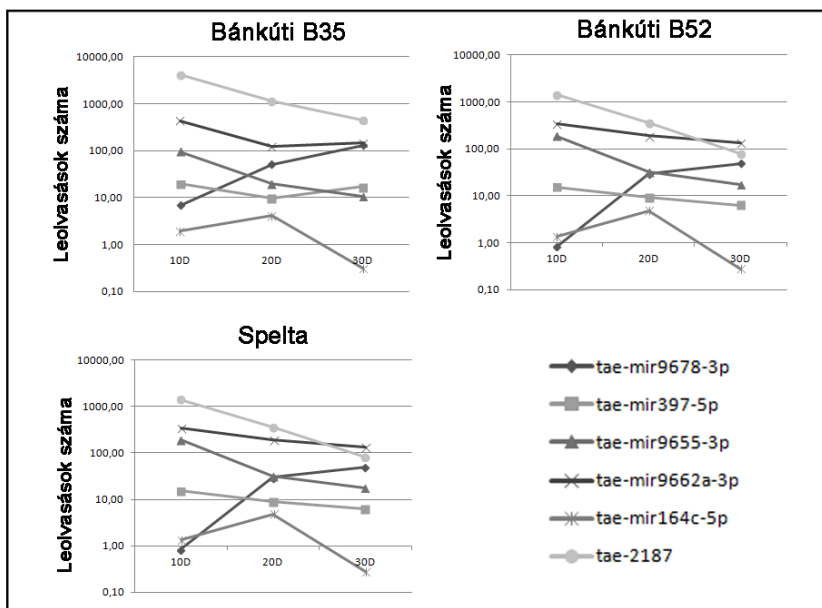
már búzában leírt miRNS volt, a többi pedig más élőlényben már felfedezett konzervatív miRNS.



18. ábra: A totál RNS-ből (T) és a visszaizolált kis RNS-ből (P) készített búzamazag kis RNS könyvtárak közti variabilitás. (A), (B) Nyers leolvasási adatok alapján; (C), (D) – Normalizált leolvasási adatok alapján; **1** – Nyers leolvasás; **2** – Leolvasások száma az adapter eltávolítást és a méret szelekciót követően; **3** – Leolvasások száma az alacsony abundanciájú leolvasások (<3) eltávolítását követően; **4** – Leolvasások száma a tRNS és rRNS szekvenciák eltávolítását követően; **5** – A búza referencia genomra illeszthető szekvenciák száma; **6** – Potenciális miRNS-ek leolvasásának a száma; **7** – a miRBase adatbázisban megtalált miRNS szekvenciák leolvasásának száma; **8** – a miRBase adatbázisban megtalált búza miRNS szekvenciák leolvasásának száma; a *dobozok* az adatok középső 50%-át tartalmazzák; a *doboz felső sarka* az adatok 75%-át, az *alsó sarka* az adatok 25%-át jelzi; a dobozban lévő *vonal* a mediánt, a *fekete rombusz* pedig az átlagot jelöli; a dobozból kiinduló *vertikális vonalak végei* a maximum és a minimum értéket jelölik.

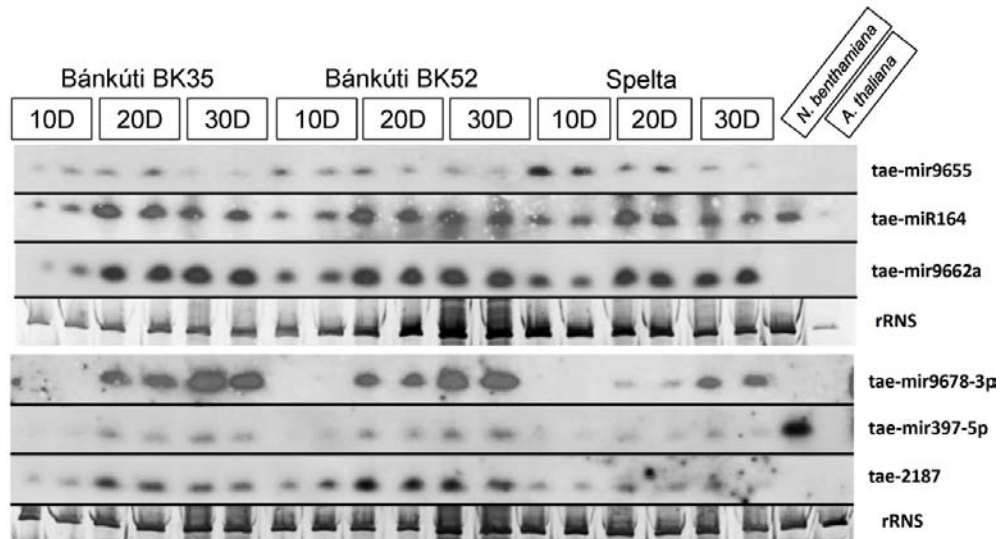
4.2.2 Kis RNS könyvtárak validálása northern hibridizációval

A kis RNS könyvtárak adatainak validálásához 6 reprezentatív miRNS kiválasztásával kis RNS northern hibridizációt alkalmaztunk. Olyan miRNS-eket választottunk ki, amelyek mennyiségében legalább két időpontot nézve szignifikáns eltérés mutatkozott a kis RNS szekvenálás során (19. ábra). A kiválasztott miRNS-ek közül négy búza specifikus (tae-miR9678-3p, tae-miR9655, tae-miR9662a-3p és tae-2187), melyek közül egy még leíratlan miRNS (tae-2187), a maradék kettő pedig konzervatív miRNS (tae-miR397-5p és tae-miR164c-5p). A kísérletben ugyanazokat az RNS mintákat használtuk fel, amelyekből a könyvtárak is készültek. Két membránt hoztunk létre, melyek mindegyike tartalmazta az összes RNS mintát (18 db). A két membránt 3-3 alkalommal hibridizáltattuk (20. ábra) a különböző miRNS-eket detektáló radioaktív próbákkal. Az egyes hibridizációk között a membránokról az előzőleg rákötött próbákat eltávolítottuk.

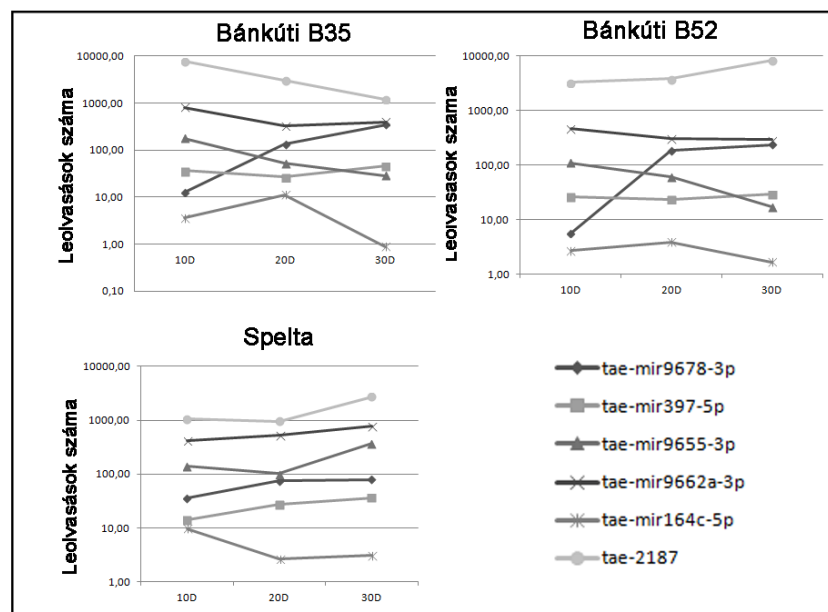


19. ábra: A kis RNS könyvtárak northern hibridizációval történő validálásához kiválasztott miRNS-ek leolvasásainak száma (a biológiai ismétlések átlagában) az egyes mintaszedési időpontokban (*X-tengely*) a tisztított kis RNS frakcióból készített könyvtárak (P) adatai alapján; *Y-tengely* – a nyers adatokra normalizált leolvasások száma logaritmikus skálán

Arra a megállapításra jutottunk, hogy legtöbb esetben a northern hibridizációval kapott eredmények nem támasztják alá a kis RNS könyvtár szekvenálási adatokat. A könyvtárak adatai szerint, a 6 kiválasztott miRNS megközelítően azonos lefutású görbét mutat az egyes mintáknál (B35, B52, Spelta) a mintaszedési időpontok tekintetében (19. ábra), ugyanakkor a northern hibridizációval csak a tae-miR9678-3p és a tae-miR9655 miRNS esetében tapasztaltunk megközelítően egybevágó eredményt (20. ábra). A 10 és a 20 napos minták közötti különbségek esetében a többi miRNS-nél többnyire ellentétes változást tapasztaltunk. A 20 és 30 napos minták közti változások viszont már sokkal jobban követték a kis RNS könyvtár leolvasási adatokat. Mivel a 20 és 30 napos mintáknál a 10 naposokhoz képest akár kétszer több transzfer és riboszómális RNS eredetű szekvenciát távolítottunk el a feldolgozás során (6. sz. Melléklet), az nagyban torzíthatja az eredményinket, ha a nyers leolvasásokra normalizálunk. Ezért ezt követően a normalizálást újra elvégeztük a szűrt leolvasások számára, tehát így csak a prediktált miRNS szekvenciákat vettük számba.



20. ábra: A kis RNS könyvtárak kis RNS northern hibridizációval történő validálása. 10D – 10 napos magminták, 20D – 20 napos magminták, 30D – 30 napos magminták (2-2 biológiai ismétléssel); Kontroll minták: *N. benthamiana*, *A. thaliana* levélből kivont RNS minták; *rRNS* – etidium bromiddal festett riboszómális RNS, mint mintafelviteli kontroll



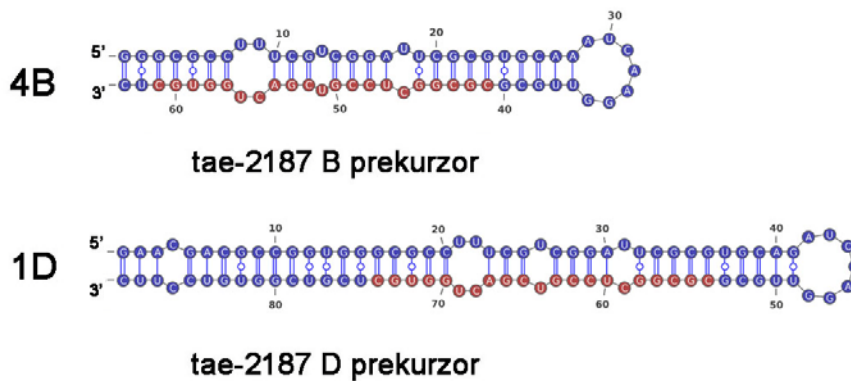
21. ábra: A kis RNS könyvtárak northern hibridizációval történő validálásához kiválasztott miRNS-ek leolvadásainak száma (a biológiai ismétlések átlagában) az egyes mintaszedési időpontokban (*X-tengely*) a tisztított kis RNS frakcióból készített könyvtárak (P) adatai alapján; *Y-tengely* – a szűrt adatokra normalizált leolvadások száma logaritmikus skálán

Az így kapott eredmény (21. ábra) alapján sem mondhatjuk el, hogy a northern hibridizáció teljesen egybevágna a kis RNS könyvtár bioinformatikai kiértékelésével. A tae-2187-es (B52 és Spelta), a tae-mir9662a (Spelta) és a tae-mir397 (Spelta) esetében javult a miRNS leolvadások korrelációja a northern hibridizáció

eredményéhez viszonyítva, ugyanakkor több esetben romlott (*tae-mir9655* (Spelta), *tae-mir164c* (Spelta)).

4.2.3 A *tae-2187*-es miRNS és prekurzorai azonosítása

A könyvtárakban találtunk egy olyan, eddig leíratlan, 21 nt-os miRNS-t (*tae-2187*, 5'- CGCGGCTCCGTCGACTGGTGC -3'), amely az összes mintában a legmagasabb, vagy a második legmagasabb leolvasási értéket képviselte. A miRNS prekurzorát (22. ábra) a búza két genomján is megtaláltuk (B és D genom), az egyik 63 a másik 89 nukleotid hosszúságú, amely méret kimondottan előnyös a mesterséges miRNS-ként történő felhasználásra. A miRNS-t kis RNS northern hibridizációval is kimutattuk (20. ábra).



22. ábra: A *tae-2187* azonosítójú, új búza miRNS prekurzorainak másodlagos RNS szerkezete. *4B* – búza B genom, 4. kromoszóma; *1D* – búza D genom 1. kromoszóma

A miRNS-nek két feltételezett célszekvenciáját is azonosítottuk. Az egyik feltételezhetően a DNS-függő RNS polimeráz V enzim egyik alegysége, ami a siRNS alapú DNS metiláció egyik kulcs molekulája. A másik célszekvencia pedig feltételezhetően egy tripszin-inhibitor gén, ami a kártevőkkel szemben történő védekezés során játszik szerepet.

Új tudományos eredmények:

1. Először alakítottunk ki (WDV) vírusrezisztenciát árpa növényben mesterséges miRNS technológiával, amelyet policisztronikus konstrukcióban hoztunk létre.
2. Létrehoztunk egy árpa eredetű mesterséges miRNS prekuzort (hvu-miR171MOD), amely egyszerű átalakíthatósága és hatékony processziója révén kiválóan alkalmas árpában (vagy esetlegesen más növényben) történő géncsendesítés kivitelezésére.
3. Bebizonyítottuk, hogy a kis RNS könyvtárak készítése során jelentős információ nyereséget eredményez, ha a könyvtárakat gélből visszaizolált kis RNS frakcióból készítjük és nem közvetlenül totál RNS-ből.
4. Búza kis RNS könyvtár szekvenálás során azonosítottunk egy nagy leolvasási számmal rendelkező, eddig ismeretlen miRNS-t, melynek expresszióját kísérletesen is igazoltuk és prekuzorait a búza két genomján (B és D) is megtaláltuk, amik szerkezetük alapján alkalmasak lehetnek mesterséges miRNS prekuzorként történő felhasználásra.

Eredményeink nagy részét az alábbi cikkekben publikáltuk:

Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Várallyay, É., Jenes, B. and Havelda, Z. (2015), Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to *Wheat dwarf virus* in barley is highly efficient at low temperature. *Molecular Plant Pathology*. 17: 427–437. doi: 10.1111/mpp.12291 Impact Factor: 4.72

Tibor Nagy*, András Kis*, Szilárd Poliska, Endre Barta, Zoltán Havelda, and Ferenc Marincs (2016), Comparison of small RNA next-generation sequencing with and without isolation of small RNA fraction. *BioTechniques*, Vol. 60, No. 6, June 2016, pp. 273–278, Impact Factor: 2.95

Bálint Jeannette, Kis András, Taller Dénes, Nagy Tibor, Barta Endre, Molnár János, Tusnády E. Gábor, Marincs Ferenc és Havelda Zoltán (2015), Az RNS interferencia szerepe a növények patogénekkal szembeni védekezésében és a fejlődésbiológiai folyamatokban. *NÖVÉNYVÉDELEM*, 51 (12): 539-549

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 WDV rezisztencia mesterséges miRNS alkalmazásával

5.1.1 Árpa *hvu-miR171*, mint mesterséges miRNS prekursor

Az amiRNS technológia vírusokkal szemben történő felhasználásának egyik sarkalatos pontja a miRNS prekursor kiválasztása. Az egyes prekursorok különböző miRNS expressziót biztosítanak és a végrehajtó komplexbe (RISC) történő beépülésükben és ebből adódóan a csendesítés hatékonyságában is különbségek lehetnek.

A három izolált árpa prekursor közül kettő esetben tudtunk northern hibridizációval kimutatni miRNS felhalmozódást. A 159-es miRNS esetében nem csak a 21 nt-os tartományban detektáltunk kis RNS-t, amely hátrányos tényező abból a szempontból, hogy a felhasználni kívánt PTGS útvonalon a 21 nukleotidos miRNS-ek a biológiailag aktívak. A különböző más méretű (22-24 nt) kis RNS-ek biogenezeise csökkenti a számunkra hasznos (21 nukleotidos) kis RNS-ek mennyiségét. A 397-es miRNS érését nem tudtuk igazolni az általunk izolált prekuzorról. A későbbiekben kiderült, hogy a 397-es miRNS esetében a miRBase adatbázis téves szekvenciát közölt (3 nukleotid elcsúszás 5' irányba), ezért az arra tervezett DNS oligóval valószínűleg nem tudtuk kimutatni a prekuzorról érő tényleges 397-es miRNS-t.

Az árpa *hvu-MIR171*-es miRNS gén prekuzora kísérleteink alapján kiválóan alkalmasnak bizonyult a mesterséges miRNS-ként történő felhasználásra. A 10 átalakított prekuzor közül 7-nél tudtunk mérhető amiRNS jelet kimutatni a northern hibridizációk alkalmával és a 6 esetben pedig az amiRNS-ek biológiai aktivitását is bebizonyítottuk. Hozzá kell tennünk, hogy nem minden működő amiRNS-t tudtunk kimutatni kis RNS northern hibridizációval, ami a kis RNS diagnosztizáló rendszer gyengeségének tudható be. Ezért a jövőben – ahogyan azt már a transzgenikus árpa növényeknél is tettük – fontosnak tartjuk a kis RNS-ek kémiai keresztkötésekkel (Pall et al., 2007) történő membránra rögzítését, illetve a sokkal érzékenyebb kimutatást lehetővé tevő, kereskedelemben forgalmazott kis RNS hibridizációs puffer (ULTRAHyb-Oligo; Ambion Inc., Austin, TX, USA) használatát.

Eredményeink azt igazolják, hogy az árpa *hvu-miR171*-es miRNS prekuzor kiválóan alkalmas akár három különböző amiRNS egyszerre történő

expresszáltatására policisztronikus konstrukcióban. A vírus mutációkkal történő rezisztencia törésének elkerülése szempontjából ez fontos kritérium.

5.1.2 Az amiRNS-ek által nyújtott rezisztencia korlátai

Az eredményeinkből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a policisztronikus konstrukcióról kialakuló amiRNS-ek expressziója negatív korrelációt mutat a WDV szisztemizálódás mértékével. Mivel a bejutott vírus DNS genomokat a rendszer nem képes degradálni, csupán a róluk képződő *replikáz* RNS-eket, ezért bizonyos idő elteltével magasabb kezdeti amiRNS szint mellett is (VB9, VB10 vonalak) képes lehet a vírus a szisztemizálódásra.

Úgy gondoljuk, hogy az általunk használt WDV fertőzési rendszer meglehetősen „túlméretezett” a természetes körülményekhez képest, hiszen a szántóföldön nem feltétlenül töltenek el a vektorok egy adott növényen 7 teljes napot, tehát egységnyi idő alatt egy növénybe kevesebb vírus genom juthat be szántóföldi körülmények között. Ezért mindenképpen érdemes lenne a jövőben a növények szántóföldi kipróbálása, természetes fertőzési és időjárás körülmények között. De tekintve, hogy ezek a vonalak többszörösen is a GMO-k hatáskörébe tartoznak (policisztronikus amiRNS és a hygromycin rezisztencia gén), valószínűleg hazánkban nem lesz kivitelezhető ez a kísérlet a közeljövőben.

Bár az amiRNS-eknek nagyon kis eséllyel lehetnek magasabb rendű élőlényekre gyakorolt közvetlen hatásaik, a jövőben egy bioinformatikai analízissel érdemes lenne megvizsgálni az esetleges humán vagy állati amiRNS-célszekvencia kapcsolatokat, illetve az amiRNS-ek jelenlétét az érett szemtermésben. Ezen kívül megfontolandó lenne egy olyan promóter szekvencia használata, amely lehetővé teszi, hogy az amiRNS expresszió a magban ne történjen meg. Konkrét példával élve a kukorica *legumin1* gén trunkált irányító szekvenciája (LEG6) kiváló választás lehetne. A promóter segítségével, rizsben végrehajtott GUS riporter fehérje expresszió bizonyította, hogy az irányító szekvencia a növény minden szövetrészében aktív, kivéve a generatív részeket (virágzat, embrió, endospermium) (Dong et al., 2015).

5.2 Búza kis RNS könyvtárak előállítás

Új miRNS-ek és prekurzoraik illetve a miRNS-ek célszekvenciáinak felfedezése nem csak a fejlődésbiológiai ismereteink bővítését szolgálhatja, hanem a mesterséges

miRNS-sel történő RNS csendesítési eljárások eszközrendszerét is bővítheti és hatékonyabbá teheti.

A búza (*Triticum aestivum* L.) kiváló alany arra, hogy új miRNS prekursorokat keressünk, mivel genomja ($2n=6x=42$, AABBDD) három különböző faj kromoszóma készletéből tevődik össze, aminek következtében potenciálisan több különböző miRNS prekuzort is tartalmazhat.

5.2.1 Búza kis RNS könyvtárak minőségi jellemzése

A két módszerrel (totál RNS-ből (T) és tisztított kis RNS frakcióból (P)) elkészített kis RNS könyvtárak között meglehetősen nagy minőségi különbségeket tapasztaltunk. Ezek az eltérések főként abból adódhatnak, hogy a 15-30 nukleotid nagyságú kis RNS-ek gélből történő visszaizolálásával a rendszerből eltávolítottuk a különböző kis sejtmagi RNS-eket (>60 nukleotid), illetve az RNS tisztítás során keletkező különböző méretű RNS törmelékek nagy részét, melyek lekötik a kis RNS könyvtárak készítése során használt adapter szekvenciákat, gyengítve ezzel a rendszer érzékenységét. Ezt tükrözi, hogy a tisztítással készített könyvtárak (P) esetében mintegy 68%-kal több potenciális, egyedi miRNS szekvenciát tudunk azonosítani, mint a közvetlenül totál RNS-ből készített könyvtáraknál (T).

A kis RNS könyvtárak mennyiségi validálására végzett northern hibridizáció eredménye nem minden esetben támasztotta alá a bioinformatikai elemzést. Ezek a különbségek részben talán arra vezethetők vissza, hogy a 10 napos kis RNS könyvtárak esetében a szűrések során sokkal kevesebb transzfer és riboszómális RNS szekvenciát kellett eltávolítanunk, mint a 20 és a 30 napos mintáknál (6. sz. Melléklet). Bár a kis RNS könyvtárakat újra normalizáltuk a szűrt adatokra, de az eredmények sajnos így sem tükrözték a northern hibridizáció eredményét. Mivel a rendszer feltehetően nem képes minden transzfer és riboszómális RNS szekvenciát eltávolítani előfordulhat, hogy a 20 és 30 napos mintáknál lényegesen több ilyen szekvencia maradt a rendszerben, mint a 10 naposoknál. Hozzá kell még tennünk azt is, hogy nem vizsgáltuk meg, hogy a rendszer tartalmaz-e esetleg olyan szekvenciákat, amelyek 1-2 nukleotidos eltéréssel megegyezhetnek a vizsgált miRNS-sel, amikkel a miRNS-ekre specifikus próbák még képesek lehetnek hibridizálni.

Mindezek következtében a jövőben elengedhetetlennek tartjuk a nyers adatok megfelelő normalizálását és az elemzésekkel feltárt biológiai összefüggések

kísérletes munkával (northern hibridizáció, Real-time PCR) történő validációját, illetve hogy egy *in silico* analízissel kiszűrjük az adott miRNS-sel hasonlóságot mutató (1-2 nukleotid eltérés) kis RNS-eket, amelyek torzíthatják a northern hibridizáció eredményét.

5.2.2 Új búza miRNS prekursor amiRNS expresszálatásra

A WDV-re tervezett amiRNS-eket úgy hoztuk létre, hogy azok nem csak a WDV árpa törzseire, hanem a búzát fertőző törzsekre is alkalmasak legyenek, ezért a későbbiekben szeretnénk a rendszert búza növényben is létrehozni némi módosítással. Kísérleteink során kiderült, hogy a vírus-specifikus amiRNS-ek mennyisége fordított arányban van a virális cél RNS-sel, amelyből az következik, hogy az amiRNS-ek mennyiségét lehetőség szerint maximalizálni kell. Az amiRNS-ek expresszióját két fő tényező befolyásolhatja: a transzkripció szintjét és helyét meghatározó promóter szekvencia, illetve a felhasznált miRNS prekursor szekvencia, amely az adott amiRNS processzióját határozza meg. Mivel az irányító szekvenciák tekintetében túl sok választási lehetőség nem akad, érdemes olyan miRNS prekuzort választani, amely hatékony processziója révén adott transzkripció mellett is magasabb amiRNS szintet biztosít.

A tae-2187-es azonosítóval ellátott miRNS szintje minden egyes könyvtárunkban a második vagy a harmadik helyet foglalta el, amely azt is feltételezheti, hogy egy igen jól processzáldó prekuzorról alakul ki. A miRNS prekuzorait azonosítottuk a búza két genomján (B és D). A jövőben szeretnénk a két prekuzort DNS szinten izolálni, megvizsgálni az általuk biztosított kis RNS felhalmozódás szintjét 35S promóterrel meghajtott konstrukcióban, illetve meg szeretnénk vizsgálni amiRNS átalakításra való alkalmasságukat.

A prekuzorok méretük alapján mindenképpen alkalmasnak mondhatók mesterséges miRNS-sé történő átalakításra és az expressziójuk is azt sugallja, hogy egy meglehetősen jól processzáldó miRNS-ről lehet szó. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a prekuzorról érő miRNS szekvencia 'C' kezdő nukleotiddal rendelkezik, amely tulajdonságából fakadóan nagyobb eséllyel épül be a szintén PTGS útvonalat kiszolgáló AGO5 fehérjébe (Mi et al., 2008), ami főként az antivirális géncsendesítésben, de különböző fejlődési folyamatok szabályozásában is szerepet játszik (Vaucheret, 2008).

Természetesen a feltételezést, hogy a tae-2187-es miRNS az AGO5 fehérjébe épül be kísérletekkel (immunoprecipitáció, northern hibridizáció, stb.) igazolni kell. Érdekes lenne megvizsgálni, hogy mi történik, ha a vírus-specifikus amiRNS-ek 'C'-vel kezdődnek és nem 'U'-val, aminek következtében egy másik PTGS útvonalon keresztül hozhatják létre a géncsendesítés folyamatát. Hozzáteve, hogy az 'U'-val kezdődő kis RNS-ek az AGO1-be épülnek be, aminek mennyiségét a miR168-as miRNS szabályozza szintén a PTGS útvonalon keresztül. Kimutatták, hogy a 168-as miRNS szintje a vírus fertőzés hatására megemelkedik, csökkentve ezzel a virális védekezésben is résztvevő AGO1 fehérje szintet (Várallyay et al., 2010). Az AGO5 fehérje expressziója *Arabidopsisban* mérve a levélben, szárban meglehetősen alacsony, főként a generatív szervekben található meg nagyobb mennyiségben (Mallory és Vaucheret, 2010). Ugyanakkor *Cucumber mosaic virus* (CMV) és *Potato virus X* (PVX) fertőzött *Nicotiana benthamiana* és *Arabidopsis thaliana* növényekben megemelkedik az AGO5 szintje és a virális siRNS-ek megkötésével részt vesz a vírus csendesítésben (Brosseau és Moffett, 2015).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A globális klímaváltozás hatására megnövekedett biotikus stressz az egyik legnagyobb kihívást jelenti a növénytermesztésben világszerte. A magasabb hőmérséklet és az elhúzódó őszi és tavaszi klímaviszonyok kedvezően hatnak a vírusbetegségek kialakulására. Ez a jelenség különösen igaz a rovarok által közvetített vírusbetegségek esetében, ahol a felmelegedés következtében a rovarvektorok migrációs potenciálja is megnövekedett. A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus – WDV) egy gazdaságilag jelentős, kabócák által terjesztett DNS vírus, amely a *Mastrevirus* nemzetséghez (*Geminiviridae* család) tartozik. Az egyes WDV törzsek fertőzése árpán jellegzetes sárgulásos, törpüléssel jár, ami jelentős termés kieséshez vezet.

Mivel a vírussal szemben nincs megfelelő rezisztenciaforrás, elengedhetetlen egy biotechnológiai védekezés kidolgozása, amely hatékony és biztonságos immunitást biztosít a WDV törzsek széles köréhez. Ezért egy árpa miRNS prekuzort (hvu-miR171) felhasználva, mesterséges miRNS-eket (artificial miRNA – amiRNS) terveztünk, melyek a WDV törzsek különböző konzervatív szekvencia elemeit célozzák meg. A potenciális amiRNS szekvenciákat úgy választottuk ki, hogy azok nem kívánt géncsendesítési hatása minimális legyen az árpa növényben. Egy tranziens szenzor rendszerben is megvizsgáltuk őket, hogy kiválasszuk közülük azokat, melyek alacsony hőmérsékleten (12-15 °C) is hatékony csendesítést biztosítanak. Mindezek alapján építettünk egy három amiRNS-t egyszerre expresszáló, polycisztronikus amiRNS prekuzor konstrukciót (VirusBuster171). A konstitutívan meghajtott konstrukcióval árpát transzformáltunk. A transzgenikus vonalakat 12-15 °C-on fertőztük meg, amely imitálja az őszi és a kora tavaszi szántóföldi állapotokat, amikor a jelentősebb WDV fertőzések bekövetkeznek. Sikerült létrehozni egy olyan árpavonalat, amely teljes rezisztenciát mutatott a rovar-közvetített WDV fertőzéssel szemben. Munkánk során bebizonyosodott, hogy az amiRNS technológia kiváló eszköz lehet arra, hogy hatékony rezisztenciát érjünk el a *Geminiviridae* családba tartozó DNS vírusokkal szemben is.

A módszer alapját képező, a növény genomjából izolált miRNS prekuzorok szerkezete nagyban meghatározza a belőlük kialakuló miRNS-ek mennyiségét, ezért az új miRNS prekuzorok keresése ebben a témakörben is nagy jelentőséggel bír. Mindezek figyelembevételével munkánk során búza kis RNS könyvtárak felhasználásával azonosítottunk olyan miRNS-eket és azok prekuzorait, melyek

mennyiségükből adódóan feltehetően megfelelnek ezeknek a kritériumoknak és a jövőben felhasználhatjuk őket mesterséges miRNS-sel történő géncsendesítésre.

SUMMARY

Increasing biotic stresses imposed by climate change are major challenges for worldwide crop production. Warmer autumns and springs have a positive effect on the development and spread of plant diseases, which presents severe problems in crop production. Wheat dwarf virus (WDV) is an economically important, leafhopper-transmitted DNA virus belonging to the *Mastrevirus* genus (*Geminiviridae* family). Infection of WDV strains on barley causes typical yellowing and dwarfing symptoms of the plants and imposes severe economic loss in crop production.

Since the natural resistance resources against this virus are limited, it is indispensable to elaborate a biotechnological approach that provides effective and safe immunity to a wide range of WDV strains. We designed artificial miRNAs (amiRNAs), utilising a barley miRNA precursor backbone (hvu-miR171), targeting different conservative sequence elements of the WDV strains. Potential amiRNA sequences were selected to minimise the off-target effects and tested in a transient sensor system to select the most effective constructs at low temperature (15 °C). Based on the gained data, a polycistronic amiRNA precursor construct (VirusBuster171) expressing three amiRNAs simultaneously was built. The construct was transformed into barley under the control of a constitutive promoter. The transgenic lines were kept at 12-15 °C simulating the autumn and spring conditions when major WDV infection and accumulation occur. We could establish a stable barley transgenic line displaying resistance to insect-mediated WDV infection. Our work demonstrates that the amiRNA technology can be an efficient tool to introduce highly efficient resistance in barley against a DNA virus belonging to the *Geminiviridae* family and that this resistance is effective at low temperature where the natural insect vector mediates the infection process.

The structure of the miRNA precursors isolated from the genome of the plant largely determines the amount of miRNAs; therefore, the search for new miRNA precursors is of great importance. In the light of these considerations, we have identified miRNAs and their precursors using wheat small RNA libraries that are expected to meet these criteria and may be used in the future for gene silencing with artificial miRNA.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- AN, G., EBERT, P., MITRA, A., et al. (1989):** Binary vectors. In: *Plant Molecular Biology Manual* (GELVIN, S., SCHILPEROORT, R. és VERMA, D. eds), pp. 29-47. Springer Netherlands.
- BARTEL, D.P. (2004):** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* (116), 281-297 p.
- BARTLETT, J.G., ALVES, S.C., SMEDLEY, M., et al. (2008):** High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. In: *Plant methods* (4), 22 p.
- BAUM, J.A., BOGAERT, T., CLINTON, W., et al. (2007):** Control of coleopteran insect pests through RNA interference. In: *Nature biotechnology* (25), 1322-1326 p.
- BECHER, T., HABERLAND, G. és KOOP, H.-U. (1992):** Callus formation and plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: *Plant cell reports* (11), 39-43 p.
- BENDAHMANE, M., SCHALK, H.-J. és GRONENBORN, B. (1995):** Identification and characterization of wheat dwarf virus from France using a rapid method for geminivirus DNA preparation. In: *Phytopathology* (85), 1449-1455 p.
- BENKOVICS, A.H., VIDA, G., NELSON, D., et al. (2010):** Partial resistance to Wheat dwarf virus in winter wheat cultivars. In: *Plant Pathology* (59), 1144-1151 p.
- BHOJWANI, S.S. és DANTU, P.K. (2013):** Tissue and cell culture. In: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* pp. 39-50. Springer.
- BO, L., WU, J.-J. és FU, D.-L. (2015):** Constructing the barley model for genetic transformation in Triticeae. In: *Journal of Integrative Agriculture* (14), 453-468 p.
- BROSSEAU, C. és MOFFETT, P. (2015):** Functional and genetic analysis identify a role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. In: *The Plant cell* (27), 1742-1754 p.
- CANTO, T., ARANDA, M.A. és FERERES, A. (2009):** Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. In: *Global Change Biology* (15), 1884-1894 p.
- CHAKRABORTY, S., TIEDEMANN, A.V. és TENG, P.S. (2000):** Climate change: potential impact on plant diseases. In: *Environmental Pollution* (108), 317-326 p.
- CHIN, A.R., FONG, M.Y., SOMLO, G., et al. (2016):** Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. In: *Cell research* (26), 217-228 p.
- CHRISTENSEN, A.H. és QUAIL, P.H. (1996):** Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. In: *Transgenic Res* (5), 213-218 p.
- CILLO, F. és PALUKAITIS, P. (2014):** Transgenic resistance. In: *Adv Virus Res* (90), 35-146 p.
- CONSORTIUM, I.B.G.S. (2012):** A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. In: *Nature* (491), 711-716 p.
- CSORBA, T., KONTRA, L. és BURGYÁN, J. (2015):** Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. In: *Virology* (479), 85-103 p.

- DAHLEEN, L.S. és MANOHARAN, M. (2007):** Recent advances in barley transformation. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* (43), 493-506 p.
- DAI, X. és ZHAO, P.X. (2011):** psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. In: *Nucleic acids research* (39), W155-W159 p.
- DALE, P., MARKS, M., BROWN, M., et al. (1989):** Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos. In: *Plant Science* (63), 237-245 p.
- DICKINSON, V., HALDER, J. és WOOLSTON, C. (1996):** The product of maize streak virus ORF V1 is associated with secondary plasmodesmata and is first detected with the onset of viral lesions. In: *Virology* (220), 51-59 p.
- DONG, Q., JIANG, H., XU, Q., et al. (2015):** Cloning and characterization of a multifunctional promoter from Maize (*Zea mays* L.). In: *Applied biochemistry and biotechnology* (175), 1344 p.
- FAHIM, M., MILLAR, A.A., WOOD, C.C., et al. (2012):** Resistance to Wheat streak mosaic virus generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. In: *Plant biotechnology journal* (10), 150-163 p.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., et al. (1998):** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* (391), 806-811 p.
- FONDONG, V.N., NAGALAKSHMI, U. és DINESH-KUMAR, S.P. (2016):** Novel functional genomics approaches: a promising future in the combat against plant viruses. In: *Phytopathology* (106), 1231-1239 p.
- GÁBORJÁNYI, R. (1990):** A gabonafélék vírusbetegségei-gabonavírusok. Doktori értekezés.
- GÁBORJÁNYI, R., BISZTRAY, G. és VACKE, J. (1988):** Búza törpülés vírus: Új gabonapatogén Magyarországon. In: *Novenytermeles (Hungary)* (37), 495-500 p.
- GAL-ON, A., MEIRI, E., ELMAN, C., et al. (1997):** Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. In: *Journal of virological methods* (64), 103-110 p.
- GARZÓN-TIZNADO, J.A., TORRES-PACHECO, I., ASCENCIO-IBA EZ, J., et al. (1993):** Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. In: *PHYTOPATHOLOGY-NEW YORK AND BALTIMORE THEN ST PAUL-* (83), 514-514 p.
- GAUT, B.S. (2002):** Evolutionary dynamics of grass genomes. In: *New phytologist* (154), 15-28 p.
- GOLDSTEIN, C. és KRONSTAD, W. (1986):** Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. In: *Theoretical and Applied Genetics* (71), 631-636 p.
- GUTIERREZ, C., RAMIREZ-PARRA, E., CASTELLANO, M.M., et al. (2004):** Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. In: *Veterinary microbiology* (98), 111-119 p.
- HAMILTON, A.J. és BAULCOMBE, D.C. (1999):** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. In: *Science* (286), 950-952 p.
- HANLEY-BOWDOIN, L., BEJARANO, E.R., ROBERTSON, D., et al. (2013):** Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. In: *Nature Reviews Microbiology* (11), 777-788 p.
- HARBERS, M. és KAHL, G. (2011):** *Tag-based next generation sequencing*: John Wiley & Sons,

- HARWOOD, W.A. (2014):** A protocol for high-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. In: *Cereal Genomics: Methods and Protocols*, 251-260 p.
- HOHN, T. és VAZQUEZ, F. (2011):** RNA silencing pathways of plants: silencing and its suppression by plant DNA viruses. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* (1809), 588-600 p.
- HOLME, I.B., BRINCH-PEDERSEN, H., LANGE, M., et al. (2008):** Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. In: *Plant cell reports* (27), 1833 p.
- HORVÁTH, J., GÁBORJÁNYI, R. és ALMÁSI, A. (1999):** *Növényvírusok és virológiai vizsgálati módszerek*: Mezőgazda,
- JESKE, H., LÜTGEMEIER, M. és PREIB, W. (2001):** DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. In: *The EMBO journal* (20), 6158-6167 p.
- JOLÁNKAI, M. (2005):** *Növénytermesztés tan 1 - Gabonafélék*: Mezőgazda Kiadó, pp. 202-231.
- JONES-RHOADES, M.W. (2012):** Conservation and divergence in plant microRNAs. In: *Plant molecular biology* (80), 3-16 p.
- KOZOMARA, A. és GRIFFITHS-JONES, S. (2014):** miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. In: *Nucleic acids research* (42), D68-D73 p.
- KUMAR, J., KUMAR, J., SINGH, S., et al. (2015):** Prevalence of Wheat dwarf India virus in wheat in India. In: *Curr Sci India* (108), 260 p.
- KUNG, Y.J., LIN, S.S., HUANG, Y.L., et al. (2012):** Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus. In: *Molecular plant pathology* (13), 303-317 p.
- KVARNHEDEN, A., LINDBLAD, M., LINDSTEN, K., et al. (2002):** Genetic diversity of Wheat dwarf virus. In: *Archives of virology* (147), 205-216 p.
- LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M., et al. (2009):** Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. In: *Genome biology* (10), R25 p.
- LAURESSERGUES, D., COUZIGOU, J.-M., SAN CLEMENTE, H., et al. (2015):** Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. In: *Nature* (520), 90-93 p.
- LAZAROWITZ, S.G. (1986):** The molecular characterization of geminiviruses. In: *Plant Mol Biol Rep* (4), 177-192 p.
- LINDBLAD, M. és SIGVALD, R. (2004):** Temporal spread of wheat dwarf virus and mature plant resistance in winter wheat. In: *Crop Protection* (23), 229-234 p.
- LINDBLAD, M. és WAERN, P. (2002):** Correlation of wheat dwarf incidence to winter wheat cultivation practices. In: *Agriculture, ecosystems & environment* (92), 115-122 p.
- LINDSTEN, K. és VACKE, J. (1991):** A Possible Barley Adapted Strain of Wheat Dwarf Virus (Wdv). In: *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica* (26), 175-180 p.
- LIU, H., BOULTON, M.I., OPARKA, K.J., et al. (2001a):** Interaction of the movement and coat proteins of Maize streak virus: implications for the transport of viral DNA. In: *Journal of general virology* (82), 35-44 p.
- LIU, H., LUCY, P., DAVIES, J.W., et al. (2001b):** A single amino acid change in the coat protein of Maize streak virus abolishes systemic infection, but not

- interaction with viral DNA or movement protein. In: *Molecular plant pathology* (2), 223-228 p.
- LIU, Y.-C., CHEN, W.L., KUNG, W.-H., et al. (2017):** Plant miRNAs found in human circulating system provide evidences of cross kingdom RNAi. In: *BMC genomics* (18), 112 p.
- LIU, Y., JIN, W., WANG, L., et al. (2014):** Replication-associated proteins encoded by Wheat dwarf virus act as RNA silencing suppressors. In: *Virus research* (190), 34-39 p.
- LORENZ, R., BERNHART, S.H., ZU SIEDERDISSEN, C.H., et al. (2011):** ViennaRNA Package 2.0. In: *Algorithms for Molecular Biology* (6), 26 p.
- LUPOTTO, E. (1984):** Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos. In: *Annals of botany* (54), 523-530 p.
- MALLORY, A. és VAUCHERET, H. (2010):** Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. In: *The Plant cell* (22), 3879-3889 p.
- MANURUNG, B., WITSACK, W., MEHNER, S., et al. (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. In: *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* (112), 497-507 p.
- MARTIN, M. (2011):** Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. In: *EMBnet. journal* (17), pp. 10-12 p.
- MATEOS, J.L., BOLOGNA, N.G., CHOROSTECKI, U., et al. (2010):** Identification of microRNA processing determinants by random mutagenesis of Arabidopsis MIR172a precursor. In: *Current Biology* (20), 49-54 p.
- MATHIONI, S.M., KAKRANA, A. és MEYERS, B.C. (2017):** Characterization of Plant Small RNAs by Next Generation Sequencing. In: *Current Protocols in Plant Biology*, 39-63 p.
- MEYERS, B.C., AXTELL, M.J., BARTEL, B., et al. (2008):** Criteria for annotation of plant MicroRNAs. In: *The Plant cell* (20), 3186-3190 p.
- MI, S., CAI, T., HU, Y., et al. (2008):** Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5 terminal nucleotide. In: *Cell* (133), 116-127 p.
- NAVARRO, L., DUNOYER, P., JAY, F., et al. (2006):** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. In: *Science* (312), 436-439 p.
- NAWAZ-UL-REHMAN, M.S. és FAUQUET, C.M. (2009):** Evolution of geminiviruses and their satellites. In: *FEBS letters* (583), 1825-1832 p.
- NAWROCKI, E.P., BURGE, S.W., BATEMAN, A., et al. (2014):** Rfam 12.0: updates to the RNA families database. In: *Nucleic acids research*, gku1063 p.
- NEVO, E. (2013):** Evolution of wild barley and barley improvement. In: *Advance in Barley Sciences* pp. 1-23. Springer.
- NIU, Q.W., LIN, S.S., REYES, J.L., et al. (2006):** Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. In: *Nature biotechnology* (24), 1420-1428 p.
- NOWARA, D., GAY, A., LACOMME, C., et al. (2010):** HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. In: *The Plant cell* (22), 3130-3141 p.
- NYGREN, J., SHAD, N., KVARNHEDEN, A., et al. (2015):** Variation in Susceptibility to Wheat dwarf virus among Wild and Domesticated Wheat. In: *PloS one* (10), e0121580 p.

- ORDON, F., HABEKUSS, A., KASTIRR, U., et al. (2009):** Virus Resistance in Cereals: Sources of Resistance, Genetics and Breeding. In: *Journal of Phytopathology* (157), 535-545 p.
- ORDON, F. és PEROVIC, D. (2013):** Virus resistance in barley. In: *Varshney rK, Tuberosa r (eds) Translational genomics for crop breeding* (1), 63-75 p.
- PALL, G.S., CODONY-SERVAT, C., BYRNE, J., et al. (2007):** Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. In: *Nucleic acids research* (35), e60 p.
- PAPP, M., TAKÁCS, A., GÁBORJÁNYI, R., et al. (2017):** *A búza törpülés vírus (WDV) dominanciája a dél-magyarországi őszi búza kísérletekben.* Budapest: XXIII. Növénynevelési Tudományos Nap, ISBN: 978-963-8351-44-9,
- PILARTZ, M. és JESKE, H. (1992):** Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. In: *Virology* (189), 800-802 p.
- POLSON, A. és VON WECHMAR, M.B. (1980):** A novel way to transmit plant viruses. In: *Journal of general virology* (51), 179-181 p.
- PRASLICKA, J. (1997):** Influence of occurrence of Psammotettix alienus on the degree of attack of winter wheat with wheat dwarf virus (WDV). In: *Rostlinna Vyroba* (43), 81-85 p.
- PRIBÉK, D., POCSAY, E., VIDA, E., et al. (2006):** Presence of Wheat dwarf virus, Cereal yellow dwarf virus - RPV and Barley yellow dwarf viruses in cereal species in Martonvásár. In: *Cereal Research Communications* (34), 625-628 p.
- QU, J., YE, J. és FANG, R. (2007):** Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. In: *Journal of virology* (81), 6690-6699 p.
- RAMSELL, J.N.E., BOULTON, M.I., MARTIN, D.P., et al. (2009):** Studies on the host range of the barley strain of Wheat dwarf virus using an agroinfectious viral clone. In: *Plant Pathology* (58), 1161-1169 p.
- ROGERS, K. és CHEN, X. (2013):** Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. In: *The Plant cell* (25), 2383-2399 p.
- ROOS, J., HOPKINS, R., KVARNHEDEN, A., et al. (2011):** The impact of global warming on plant diseases and insect vectors in Sweden. In: *European Journal of Plant Pathology* (129), 9-19 p.
- SCHUBERT, J., HABEKUß, A., KAZMAIER, K., et al. (2007):** Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany—diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. In: *Virus research* (127), 61-70 p.
- SCHUBERT, J., HABEKUß, A. és RABENSTEIN, F. (2003):** Investigation of differences between wheat and barley forms of Wheat dwarf virus and their distribution in host plants. In: *PLANT PROTECTION SCIENCE-PRAGUE* (38), 43-48 p.
- SCHUSTER, S.C. (2008):** Next-generation sequencing transforms today's biology. In: *Nature methods* (5), 16 p.
- SCHWAB, R., OSSOWSKI, S., RIESTER, M., et al. (2006):** Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. In: *The Plant cell* (18), 1121-1133 p.
- ŞENER, O., CAN, E., ARSLAN, M., et al. (2008):** Effects of genotype and picloram concentrations on callus induction and plant regeneration from immature inflorescence of spring barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (22), 915-920 p.

- SHARMA, V.K., HÄNSCH, R., MENDEL, R.R., et al. (2007):** Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat. In: *Plant cell, tissue and organ culture* (88), 21-33 p.
- SILHAVY, D., MOLNAR, A., LUCIOLI, A., et al. (2002):** A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. In: *The EMBO journal* (21), 3070-3080 p.
- STANLEY, J., BOULTON, M.I. és DAVIES, J.W. (2005):** Geminiviridae. In: *eLS*, p.
- SZITTYA, G., SILHAVY, D., MOLNAR, A., et al. (2003):** Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. In: *The EMBO journal* (22), 633-640 p.
- SZUNICS, L., POCSAI, E., SZUNICS, L., et al. (2000):** Viral diseases on cereals in central Hungary. In: *Acta Agronomica Hungarica* (48), 237-250 p.
- THOLT, G. (2011):** A szipókás rovarok táplálkozásának vizsgálati módszere - az elektro-petrográfia (EPG) bemutatása. In: *Növényvédelem* (47), 160-165 p.
- TINGAY, S., MCELROY, D., KALLA, R., et al. (1997):** Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. In: *The Plant Journal* (11), 1369-1376 p.
- TIWARI, M., SHARMA, D. és TRIVEDI, P.K. (2014):** Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. In: *Plant molecular biology* (86), 1-18 p.
- TÓBIÁS, I., KISS, B., PÁJTLI, É., et al. (2008):** A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus) árpa törzsének jellemzése, és átviteli kísérletek. In: *Növényvédelem* (44), 545-552 p.
- TREBICKI, P., NANCARROW, N., COLE, E., et al. (2015):** Virus disease in wheat predicted to increase with a changing climate. In: *Glob Chang Biol*, p.
- VACKE, J. (1961):** Wheat dwarf virus disease. In: *Biologia Plantarum* (3), 228-233 p.
- VAN DER KROL, A.R., MOL, J.N. és STUITJE, A.R. (1988):** Antisense genes in plants: an overview. In: *Gene* (72), 45-50 p.
- VARALLYAY, E., BURGYAN, J. és HAVELDA, Z. (2008):** MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. In: *Nature protocols* (3), 190-196 p.
- VARALLYAY, E., OLAH, E. és HAVELDA, Z. (2014):** Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. In: *Nucleic acids research* (42), 599-608 p.
- VÁRALLYAY, É., VÁLÓCZI, A., ÁGYI, Á., et al. (2010):** Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. In: *The EMBO journal* (29), 3507-3519 p.
- VAUCHERET, H. (2008):** Plant argonauts. In: *Trends in plant science* (13), 350-358 p.
- VAUCHERET, H. (2009):** AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. In: *PloS one* (4), e6442 p.
- VOINNET, O. és BAULCOMBE, D.C. (1997):** Systemic signalling in gene silencing. In: *Nature* (389), 553 p.
- WANG, M.-B., MASUTA, C., SMITH, N.A., et al. (2012):** RNA silencing and plant viral diseases. In: *Mol Plant Microbe In* (25), 1275-1285 p.
- WANG, M.-B. és WATERHOUSE, P.M. (2002):** Application of gene silencing in plants. In: *Current opinion in plant biology* (5), 146-150 p.

- WERNER, S., WOLLMANN, H., SCHNEEBERGER, K., et al. (2010):** Structure determinants for accurate processing of miR172a in *Arabidopsis thaliana*. In: *Current Biology* (20), 42-48 p.
- WHITFIELD, A.E., FALK, B.W. és ROTENBERG, D. (2015):** Insect vector-mediated transmission of plant viruses. In: *Virology* (479), 278-289 p.
- WU, B., SHANG, X., SCHUBERT, J., et al. (2015):** Global-scale computational analysis of genomic sequences reveals the recombination pattern and coevolution dynamics of cereal-infecting geminiviruses. In: *Scientific reports* (5), p.
- YANG, X. és LI, L. (2011):** miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. In: *Bioinformatics* (27), 2614-2615 p.
- ZERBINI, F.M., BRIDDON, R.W., IDRIS, A., et al. (2017):** ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. In: *Journal of general virology* (98), 131-133 p.
- ZHANG, B., PAN, X., CANNON, C.H., et al. (2006):** Conservation and divergence of plant microRNA genes. In: *The Plant Journal* (46), 243-259 p.
- ZHANG, L., HOU, D., CHEN, X., et al. (2012):** Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. In: *Cell research* (22), 107-126 p.
- ZHANG, S., CHO, M.-J., KOPREK, T., et al. (1999):** Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. In: *Plant cell reports* (18), 959-966 p.
- ZHAO, M., CAI, C., ZHAI, J., et al. (2015):** Coordination of microRNAs, phasiRNAs, and NB-LRR Genes in response to a plant pathogen: Insights from analyses of a set of soybean Rps gene near-isogenic lines. In: *The Plant Genome* (8), p.
- ZHOU, Z., LI, X., LIU, J., et al. (2015):** Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. In: *Cell research* (25), 39-49 p.
- ZOHARY, D., HOPF, M. és WEISS, E. (2012):** *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*: Oxford University Press on Demand,

8. MELLÉKLETEK

1. sz. Melléklet: A felhasznált oligonukleotidok jegyzéke

Név	Szekvencia (5' - 3')
hvu-MIR171F	CGTGGTACCGACAAGAGGAGGATGCTGAAACG
hvu-MIR171R	GCATCTAGAGAACACATGCGTGCATGAAAGAG
hvu-MIR171MODF	CGTGGTACCGACAAGAGGAGGATGCTGAAACGGTCACCATGATGTTGGC
hvu-MIR171MODR	GCATCTAGAGAACACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAAGATATTGGCAC
hvu-MIR159aF	CGTGGTACCCGTAGATCTCGGTTCTTCTCTG
hvu-MIR159aR	GCATCTAGAAGTTCAAGCTCAAGGAGAGATC
hvu-MIR397aF	CGTGGTACCATGATTCTCTGCTTGCCTCTAC
hvu-MIR397aR	GCATCTAGAGTACAGTAGCTGATGAACGCC
miR159_det	CAGAGCTCCCTTCAATCCAAA (LNA oligó)
miR171_det	TCTGAGTGAGTCGAGCCAACA (LNA oligó)
miR397_det	CATCAACGCTGCACTCAACGG
amiR1F	AACGGTCACCATCAGGTTCCGAGTATATTGCAAGACCACGCC
amiR1R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAACAGGTTCCGTGTCTATTCCAAGAACCGCCG
amiR2F	AACGGTCACCATGGATGATTACTCAAGGACTCAGACCACGCC
amiR2R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAAGGACGATTATTCCAGGAGTCAGAACCGCCG
amiR3F	AACGGTCACCATGAGTGGGGATCAATCGTCGCAGACCACGCC
amiR3R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAAGAGTGGGGAACATTCCGTAGCAGAACCGCCG
amiR4F	AACGGTCACCATCTCTACTCCTTATGCCTGGAAGACCACGCC
amiR4R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAACTCTACTCCGTAAGCCTCGAAGAACCGCCG
amiR5F	AACGGTCACCATCTACTACAAGAGACTAGCTGAGACCACGCC
amiR5R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAACTACTACAACAGCCTAGTTGAGAACCGCCG
amiR6F	AACGGTCACCATGTCTCGATTAGATATACTGTAAGACCACGCC
amiR6R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAAGTCCGATTACATGTACTCTAAGAACCGCCG
amiR7F	AACGGTCACCATCCTCTTCTTACTTATCGTCAGACCACGCC
amiR7R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAACCTCTTCTAACATATCCTCAGAACCGCCG
amiR8F	AACGGTCACCATGGATCACCAGATATGCAGGTAGACCACGCC
amiR8R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAAGGATCACCACATCTGCACGTAGAACCGCCG
amiR9F	AACGGTCACCATCGATCCCGGTTTCATCCGCTAGACCACGCC
amiR9R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAACGATCCCGGGTCTCCGACTAGAACCGCCG
amiR10F	AACGGTCACCATGTAGTACACGGGACAGAGCAAGACCACGCC
amiR10R	CACACGCGTGCATGAAAGAGCACCAAGTAATACACCGGCCAGACCAAGAACCGCCG
amiR1det	CAGGTTCCGTGTCTATTCCAA
amiR2det	GGACGATTATTCCAGGAGTCA
amiR3det	GAGTGGGGAACATTCGTAGCA
amiR4det	CTCTACTCCGTAAGCCTCGAA
amiR5det	CTACTACAACAGCCTAGTTGA
amiR6det	GTCGGATTACATGTACTCTAA
amiR7det	CCTCTTCCCTAACATATCCTCA
amiR8det	GGATCACCACATCTGCACGTA
amiR9det	CGATCCCGGGTCTCCGACTA
amiR10det	GTAATACACCGGCCAGACCAA
amiR1-5targetF	CAGGTTCCGTGTCTATTCCAAGGACGATTATTCCAGGAGTCAGAGTGGGGAACATTCGT

amiR1-5targetR	TCAACTAGGCTGTTGTAGTAGTTTCGAGGCTTACGGAGTAGAGTGCTACGAATGTTCCCC
amiR6-10targetF	GTCGGATTACATGTACTCTAACCTCTTCCCTAACATATCCTCAGGATCACCACATCTGCA
amiR6-10targetR	TTGGTCTGGCCGGTGTATTACTAGTCGGAGGACCCGGGATCGTACGTGCAGATGTGGTG
WDVrepF	TGATCTAGAATGGCCTCTTCATCTGCACCCAGGTTCCGT
WDVrepR	TAAGTCGACCTGCGAAGCAGTGACATTTTCGCCGAAGGC
WDVrepDetF	CGCCTTGGACTCTCTTCGCAC
WDVrepDetR	GACGGATAGACCATTCAAACG
NOSF	TGAGGTACCTCGTTCAAACATTTGGCAAT
NOSR	TCAGAGCTCACCCGATCTAGTAACATAGA
hygF	CTGAAACCGAACTGCCCGCTG
hygr	ACCAATGCGGAGCATATACGCC
UbiDetF	AACCAGATCTCCCCAAATC
UbiDetR	AAACCAAACCCTATGCAACG
tae-miR9655_det	GTTGGCTACTTCCTTCCCTTG
tae-miR9662a_det	CGGTGGCTCTGGGATGTTCAA
tae-miR9678_det	ACAGTGTATGTCCCTCGCCAGA
tae-miR397_det	G TTCATCAACGCTGCACTCAA
miR164_det	TGCACGTGCCCTGCTTCTCCA (LNA oligó)
tae-2187	GCACCAGTCGACGGAGCCGCG

A táblázatban az aláhúzott nukleotidok a restrikciós enzimek felismerő helyeit jelölik.

2. sz. Melléklet: Bakteriális táptalajok és pufferek

LB (pH: 7,2)	mennyiség/l	YEB (pH: 7,2)	mennyiség/l
Élesztő kivonat	5 g	Élesztő kivonat	1 g
Tripton	10 g	Szarvasmarha kivonat	5 g
NaCl	10 g	N-Z-Case Plus	5 g
Kanamycin	50 mg	D-szacharóz	5 g
		Rifampicin	25 mg
		Kanamycin	50 mg

Szilárd táptalajokhoz hozzáadva 15 g bakteriológiai agar.

10 x TBE (pH: 8,8)	mennyiség/l
Tris base	162 g
Bórsav	27,5 g
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	9,5 g

10 x MAE	mennyiség/l
MOPS (pH: 7,0)	20,93 g
Na-acetát	3,28 g
EDTA	1,46 g

Church puffer	mennyiség
EDTA (pH: 8,0)	1 mM
NaPi	0,5 M
SDS	7% (w/v)
BSA	1% (w/v)

0.5 M NaPi: 134 g of Na₂HPO₄•7H₂O, 4 ml 85% H₃PO₄ 1 liter vízre feltöltve

3. sz. Melléklet: Árpa transzformációhoz használt táptalajok (1 liter)

CI-0	mennyiség/l	CI-50	mennyiség/l
MS (Duchefa, M02221)	4,3 g	MS (Duchefa, M02221)	4,3 g
réz	1,25 mg	réz	1,25 mg
kazein hidrolizátum	1g	kazein hidrolizátum	1g
myo-inozitol	250 mg	myo inozitol	250 mg
thiamin	1 mg	thiamin	1 mg
prolin	690 mg	prolin	690 mg
maltóz	30 g	maltóz	30 g
dicamba	2,5 mg	dicamba	2,5 mg
gelrite	3,5 g	gelrite	3,5 g
		hygromicin	50 mg
		cefaotxim	300 mg
TR-50	mennyiség/l	RG-0	mennyiség/l
MS (Duchefa, M0238)	2,7 g	MS (Duchefa, M0238)	2,7 g
réz	1,25 mg	NH ₄ NO ₃	165 mg
NH ₄ NO ₃	165 mg	myo inozitol	100 mg
myo inozitol	100 mg	thiamin	0,4 mg
thiamin	0,4 mg	glutamin	750 mg
glutamin	750 mg	maltóz	20 g
maltóz	20 g	gelrite	3,5 g
2-4-D	2,5 mg		
BAP	0.1 mg		
gelrite	3,5 g		
hygromicin	50 mg		
cefaotxim	300 mg		

pH: 5,8

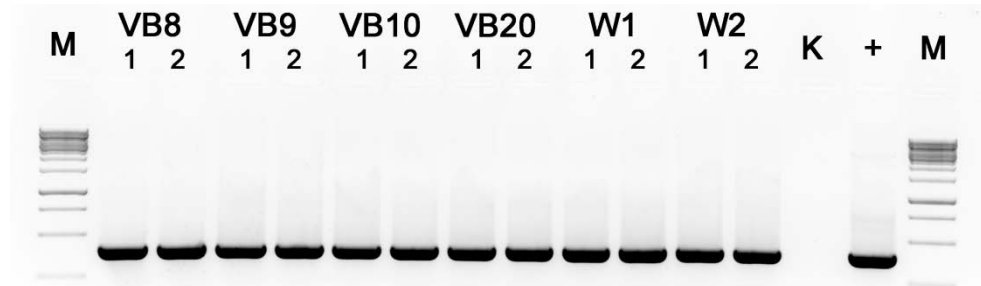
B. Movement protein gén (MP) összehasonlítás

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
RH747816_B_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
RH52282_B_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
F_J546193_B_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
FH59832_B_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
FH210034_B_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
F_J620684_B_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
J064782_U_MP ATGGATCAGGCTTTACACCGCGGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
H642217_U_MP ATGGAGGAGCGATAGCCCCCGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
FN06786_U_MP ATGGAGGAGCGATAGCCCCCGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
FN06785_U_MP ATGGAGGAGCGATAGCCCCCGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
J064796_U_MP ATGGAGGAGCGATAGCCCCCGCTCTATACGGGCGAGTCATACACGAGCCCTTACGATCCCGGGTCCCGGCTACGCTTGGGCGACCTTTGTCTCGTCCCTCGGTTTGTATATCCGTAG
smr9
Consensus atgga,cagg...t..c.cc.cgcg.t.ct.at.acggg...atcaat.acoag.cccolt..cgatcccggtcccgactacgctggcg.ac.ttggtgtg...cctgggttg.taata.ccgtag
smr9
131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
RH747816_B_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
RH52282_B_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
F_J546193_B_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
FH59832_B_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
FH210034_B_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
F_J620684_B_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
J064782_U_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
H642217_U_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
FN06786_U_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
FN06785_U_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
J064796_U_MP |AGTTTGTGGTGGCTACACCTGTTCTTGGAGGACTGCATATTTAGTGTGAGAGCGGAGAGCCGAGGAGGACCGAGGAAATTTGGTACGGTATACACCGGCGGACCGAATTTGGTACACACAGG
smr10
Consensus g.ttg.t.tgg.t.gcttaacctggt..t.gaa.ga.t..at..t.lagtgtg.naeggacaagaaca.aggagaccgaggaatgggtacgcaatracacccgacgacgaatggtgaccacaacagg
261 270273
|-----|
RH747816_B_MP |ACTCCCGAGGTAR
RH52282_B_MP |ACTCCCGAGGTAR
F_J546193_B_MP |ACTCCCGAGGTAR
FH59832_B_MP |ACTCCCGAGGTAR
FH210034_B_MP |ACTCCCGAGGTAR
F_J620684_B_MP |ACTCCCGAGGTAR
J064782_U_MP |ACTCCCGAGGTAR
H642217_U_MP |ACTCCCGAGGTAR
FN06786_U_MP |ACTCCCGAGGTAR
FN06785_U_MP |ACTCCCGAGGTAR
J064796_U_MP |ACTCCCGAGGTAR
Consensus actcccgaggtaa

```

5. sz. Melléklet: WDV replikáz specifikus PCR reakció a kabóca vektorokból a fertőzést követően. M – 1 kb GeneRuler DNS létra; 1, 2 – kabóca minták izolátoronként; K – víz kontroll; + – fertőzött növényi minta



6. sz. Melléklet: Búzamag kis RNS szekvenálás során kapott leolvasások száma és aránya az egyes szűrési lépéseket követően a nyers leolvasásokhoz viszonyítva

Könyvtár neve	Nyers leolvasás	Adapter eltáv/méret szelekció	%	Alacsony abundancia eltáv.	%	t/rRNS eltáv.	%	Búza genomra illeszthető	%	Predictált miRNS	%	miRBase találat	%	miRBase találat (búza)	%
T_B35_100_I	15156563	5985082	39.49	4198781	27.70	2922908	19.28	1943177	12.82	150830	1.00	14371	0.095	6108	0.040
T_B35_100_II	10560703	4138679	39.19	2843829	26.93	2012860	19.06	1544520	14.63	114439	1.08	12705	0.120	6176	0.058
T_B35_200_I	4978036	1802685	36.21	1234103	24.79	631452	12.68	466224	9.37	27902	0.56	2379	0.048	1075	0.022
T_B35_200_II	12665049	4972945	39.27	3647128	28.80	2040604	16.11	1716032	13.55	126954	1.00	10762	0.085	4493	0.035
T_B35_300_I	3153188	967205	30.67	681665	21.62	308882	9.80	239019	7.58	11585	0.37	1217	0.039	549	0.017
T_B35_300_II	10282980	3320674	32.29	2622299	25.50	1331992	12.95	1152858	11.21	72929	0.71	7823	0.076	3727	0.036
T_B52_100_I	8066911	3167427	39.26	2129093	26.39	1494550	18.53	1014480	12.58	70347	0.87	7422	0.092	3365	0.042
T_B52_100_II	10643935	3625301	34.06	2718402	25.54	1780370	16.73	1456167	13.68	77877	0.73	9521	0.089	3958	0.037
T_B52_200_I	2658471	1012539	38.09	700319	26.34	308417	11.60	235783	8.87	11220	0.42	1409	0.053	565	0.021
T_B52_200_II	9527805	3309063	34.73	2495972	26.20	1316431	13.82	1149283	12.06	55273	0.58	6572	0.069	2543	0.027
T_B52_300_I	3224967	990137	30.70	705035	21.86	331417	10.28	256921	7.97	11875	0.37	1174	0.036	508	0.016
T_B52_300_II	13318595	4034106	30.29	3337243	25.06	1520049	11.41	1362650	10.23	62131	0.47	5533	0.042	1976	0.015
T_Spelta_100_I	6922111	2724663	39.36	1870765	27.03	1214871	17.55	850036	12.28	54924	0.79	5801	0.084	2928	0.042
T_Spelta_100_II	10244620	3847448	37.56	2790599	27.24	1799502	17.57	1450158	14.16	79568	0.78	10330	0.101	5529	0.054
T_Spelta_200_I	18755713	4546016	24.24	3434077	18.31	1699611	9.06	1362869	7.27	41243	0.22	4274	0.023	1865	0.010
T_Spelta_200_II	10435412	3664643	35.12	2651772	25.41	1403163	13.45	1223047	11.72	51720	0.50	6134	0.059	2547	0.024
T_Spelta_300_I	3544375	1142490	32.23	832051	23.48	385715	10.88	305947	8.63	8036	0.23	971	0.027	386	0.011
T_Spelta_300_II	11318342	3556470	31.42	2857925	25.25	1347476	11.91	1208358	10.68	47446	0.42	5059	0.045	2164	0.019
P_B35_100_I	10680324	9951178	93.17	8091518	75.76	5759787	53.93	4646015	43.50	447959	4.19	44029	0.412	18038	0.169
P_B35_100_II	10414069	9682160	92.97	7400984	71.07	5630382	54.07	4152810	39.88	681013	6.54	50909	0.489	29588	0.284
P_B35_200_I	9874139	7932669	80.34	6516468	66.00	3254787	32.96	4347295	44.03	242183	2.45	26290	0.266	6550	0.066
P_B35_200_II	13091631	12573317	96.04	8024391	61.29	5287615	40.39	2864145	21.88	467109	3.57	25019	0.191	11003	0.084
P_B35_300_I	9483375	8782266	92.61	7447694	78.53	3740447	39.44	3463523	36.52	189385	2.00	11228	0.118	6717	0.071
P_B35_300_II	9484795	8133769	85.76	6948940	73.26	3380046	35.64	2985161	31.47	249120	2.63	18942	0.200	9920	0.105
P_B52_100_I	9555964	9139351	95.64	6760205	70.74	5528573	57.85	4126986	43.19	305772	3.20	19632	0.205	9376	0.098
P_B52_100_II	9948877	9517941	95.67	7165287	72.02	5249757	52.77	4159426	41.81	358728	3.61	32257	0.324	14553	0.146
P_B52_200_I	6828887	6410809	93.88	5224370	76.50	2565220	37.56	2264419	33.16	161640	2.37	11060	0.162	4371	0.064
P_B52_200_II	8826441	8480154	96.08	6177125	69.98	3955177	44.81	3278862	37.15	264828	3.00	15359	0.174	7289	0.083
P_B52_300_I	8723205	7518644	86.19	6574122	75.36	3139374	35.99	2934558	33.64	151602	1.74	7661	0.088	4559	0.052
P_B52_300_II	7157139	6586173	92.02	5433831	75.92	2541607	35.51	2343319	32.74	127136	1.78	10256	0.143	4504	0.063
P_Spelta_100_I	11401908	10376732	91.01	9064974	79.50	5936665	52.07	4829776	42.36	523112	4.59	40767	0.358	23875	0.209
P_Spelta_100_II	7362199	7034430	95.55	5218290	70.88	3917853	53.22	3085648	41.91	294228	4.00	18981	0.258	12756	0.173
P_Spelta_200_I	8600522	8009596	93.13	6041576	70.25	3192767	37.12	2814586	32.73	135092	1.57	12892	0.150	5446	0.063
P_Spelta_200_II	9370866	8918178	95.17	5033947	53.72	3373970	36.00	2831803	30.22	201720	2.15	16829	0.180	8967	0.096
P_Spelta_300_I	8408441	7553635	89.83	6758574	80.38	3188603	37.92	2956476	35.16	115875	1.38	7852	0.093	4059	0.048
P_Spelta_300_II	7190250	6336904	88.13	5273237	73.34	2483147	34.53	2270714	31.58	98280	1.37	7861	0.109	3707	0.052

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Azért, hogy ez a dolgozat létre jöjjön, nagyon sok embernek köszönettel tartozom. Időrendi sorrendben haladva, elsőként *Prof. Heszky László* akadémikus úrnak mondanék köszönetet, hogy egyetemi éveim alatt érdekesítő óráival megszerettette velem a genetikát és a növény biotechnológiát, ami által megfogalmazódott bennem a gondolat, hogy molekuláris biológus legyek. Témavezetőmnek, *Dr. Jenes Barnabásnak* köszönöm, hogy szakdolgozó koromban befogadott laborjába, ahol testközelből megismerkedhettem a molekuláris biológiával, a növényi transzformációs technikákkal és a mikroszaporítással és köszönöm neki, hogy teljes bizalommal rám bízott egy ilyen volumenű kutatást. Nagy köszönettel tartozom *Ivanics Milánnak*, aki lelkiismeretesen mentorált mind az egyetemi, mind a doktori éveim alatt. Köszönöm *Tóth Gábornak*, hogy tudását és tapasztalatait átadta az árpa szövettenyésztéssel és transzformációval kapcsolatban. Köszönettel tartozom *Dudás Brigittának*, aki mind szakmai, mind emberi vonatkozásban számtalan alkalommal segítette munkámat és rendelkezésemre bocsájtotta a Cambia vektorokat. Köszönöm *Péliné Tóth Magdolnának* a laborban nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom *Dr. Kiss József* intézetigazgató úrnak, hogy támogatta a SZIE Növénytudományi Doktori Iskolába történő állami ösztöndíjas felvételemet. Köszönöm *Dr. Bán Ritának*, hogy elvállalta témavezetésemet és mind emberi, mind szakmai szempontból mellettem állt és segítette a Ph.D munkámat.

A legnagyobb köszönettel, a project ötletgazdájának, *Dr. Havelda Zoltánnak* tartozom, aki laborjában megadott minden anyagi és szakmai segítséget, hogy munkámat létrehozhasam és mindezek mellett nem csak jó, de balsorsban is mellettem állt, ösztönzött és a publikációk megírásában is segített. Köszönöm *Dr. Várallyay Évának és Poldán Erzsébetnek* a labormunkában nyújtott segítségüket, akiktől számos molekuláris biológiai műveletet megtanulhattam. Ugyanakkor köszönöm az MBK Fejlődésbiológiai és a Diagnosztikai csoportok minden tagjának a munkám létrejöttéhez nyújtott segítségét.

Ezúton mondanék köszönetet *Dr. Tóbiás Istvánnak*, hogy az általuk izolált WDV h07-es törzset rendelkezésemre bocsájtotta. Kiemelt köszönettel tartozom *Tholt Gergelynek* a WDV fertőzés során kapott segítségéért, aki nélkül még most is Gödöllő határában gyűjtögetném a csíkos gabonakabóca imágókat.

Köszönöm *Dr. Nagy Tibornak* és *Marincs Ferencnek* a búza kis RNS könyvtárak feldolgozása során nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom *Dr. Silhavy Dánielnek* és *Dr. Dallmann Gézának* az MBK-ban történő mentori vezetésükért és szakmai tanácsaikért.

Köszönöm *Salamon Pálnak* a vírusos munkák során nyújtott segítségét és hogy sokéves szakmai és egyéb tapasztalatait megosztotta velem.

Hálásan köszönöm *szüleim* támogatását és ösztönzését, *feleségemnek* a kitartását és hogy mindvégig támogatott a doktori munkám befejezésében.

Végezetül köszönöm az OTKA-nak (81937K) és az NKFI-nek (AGR_PIAAC_13-1-2013-0074) az anyagi finanszírozást.

.....

Kis András