

1. Kukorica csőpenészt okozó Fusariumok fajösszetételének megállapítása. A különböző növényállományokból gyűjtött izolátumok párosodási képességének összehasonlítása.

Gödöllön, Martonvásáron és Szegeden vételeztünk kukorica csőmintákat, a tejes éréstől, a betakarításig. A csőpenész tüneteket mutató szemeket pepton-PCNB táptalajon tenyésztettünk, s morfológiai bélyegeket, valamint fajspecifikus PCR-eljárás segítségével azonosítottuk a gombákat. Összesen 234 izolátumot határoztunk meg, ezek faj szerinti megoszlása így alakult: *Fusarium graminearum* – 18%, *Fusarium proliferatum* – 59%, *Fusarium verticillioides* – 23%. Az eredmények jelentős eltolódást mutatnak a fajösszetételt illetően. Míg a korábbi időszakban (ahogy azt az összes hazai növénykórtani tankönyv tanítja!) a *F. graminearum* és a *Fusarium culmorum* dominált, mára a *Gibberella fujikuroi* alakkörbe tartozó fajok (*F. proliferatum*, *F. verticillioides*) előretörése tapasztalható. Valószínűleg a klímaváltozással magyarázható a mezofil és mérsékelt xerotoleráns fajok térhódítása, illetve a pszichotróf *F. culmorum* visszaszorulása. A fajspektrum módosulásával előre jelezhető, hogy a mikotoxin kockázat is változni fog. Magyarországon, szemes kukoricában eddig a dezoxivalenol (DON) és a zearalenon (ZEA) volt a két legtöbb gondot okozó mikotoxin, ma és a következő időszakban azonban fokozottan kell számolni a *F. proliferatum* és a *F. verticillioides* által termelt fumonizinek jelenlétével. Ezek sajnos mind humán-, mind állategészségügyi szempontból aggasztó változások, hiszen a fumonizinek lényegesen agresszívebb toxinok, mint a DON vagy a ZEA, s az előbbieket ráadásul alattomos karcinogének is. A csőpenész csaknem mindig kukoricamoly lárvák kártételének következménye. Emiatt különösen aggályos a GMO növények ellen megélhetési „környezettudósok” által gerjesztett politikai hisztériakeltés: a kukoricamoly lárvák ellen ugyanis a megfelelő Bt-toxingént hordozó transzgén kukorica termesztésével lehet a leghatékonyabban védekezni.

A *MAT1-1-1* és a *MAT1-2-1* párosodási típust kódoló gének konzervatív szakaszára tervezett indítószekvenciák segítségével azonosítottuk a begyűjtött *F. proliferatum* és *F. verticillioides* törzsek párosodási típusát. Mindkét fajban közel egyforma gyakorisággal fordult elő a két párosodási típus, ami arra enged következtetni, hogy mindkét fajban történhet ivaros rekombináció hazai körülmények között. Laboratóriumi pároztatási kísérletekben azonban valamennyi törzs nő-sterilnek bizonyult, amiből viszont arra következtetünk, hogy ez a két faj a tenyészidőszakban valószínűleg csak klónosan szaporodik.

2. Mykorrhiza gombák azonosítása: család-specifikus (Glomaceae, Gigasporaceae, Acaulosporaceae) PCR indítoszekvenciák tervezése és használata különböző körzetekből gyűjtött kukoricamintákban előforduló mykorrhiza-gombák azonosítására.

Az rDNS kis alegységéről a VANS1 (5'-CTAGTATAATCGTTATACAGG-3') és az NS21 (5'-AATATACGCTATTGGAGCTGG-3') primerpár segítségével, egy 720 bp nagyságú fragmentumot sikerült PCR-rel amplifikálni a kukorica gyökerekből kivont DNS mintában. Ez a fragmentum templátként szolgált a második PCR-körben a VAGLO, VAGIGA és a VAACAU család-specifikus primerekkel végzett amplifikációhoz; ez a második PCR – mykorrhiza-csoporttól függően – egy 180-190 bp nagyságú fragmentumot eredményezett. A fragmentumok nukleotid sorrendjének alapján megállapítottuk, hogy a mintákban a *Glomaceae* és a *Gigasporaceae* családba tartozó mykorrhizák fordultak elő, de hiányoztak az *Acaulosporaceae* család reprezentánsai.

Az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetének kukorica tartamkísérletében folytattunk felvételezéseket annak megállapítására, hogyan hat a kukoricánövények gyökérzetével szimbiózisban élő mykorrhiza-populáció összetételére a monokultúrás termesztés, a szervesanyag-utánpótlás és az NPK trágyázás. Ebben a kísérlet-sorozatban csak *Glomus*-nemzetségbe tartozó fajokat találtunk, de sikerült azonosítani az alábbi filotípusokat: *Glomus*-Aa (típusfajok: *Glomus mossae*, *Glomus geosporum*), *Glomus*-Ab (típusfajok: *Glomus intraradicens*, *Glomus vesiculiferum*, *Glomus coremioides* és *Glomus sinosum*), *Glomus*-Ac (típusfaj: *Glomus hoi*), *Glomus*-Ad (nincs típusfaja), *Glomus*-Ba (típusfajok: *Glomus luteum*, *Glomus claroideum*, *Glomus etunicatum*), *Glomus*-Bb (nincs típusfaja) és *Glomus*-X (filotípusba nem sorolható fajok).

A műtrágyázásban nem részesült parcellákon nevelt növényekben nagy volt a fajdiverzitás: megtaláltuk az Aa, Ab, Ac, Ad típusokat, valamint a *Glomus*-X példányokat, s dominált az Ad csoport. A 400 kg NPK trágyázásában részesült növények gyökérzetében viszont csak az Ab, Ac Ad típusok fordultak elő, méghozzá az Ac és az Ad típus közös és közel egyforma dominanciája mellett. Amikor szerves anyag utánpótlásban részesült (a kukorica szármaradványokat évről-évre beforgatták a talajba), illetve nem részesült (a területről eltávolították a növényi maradványokat) parcellákon vizsgáltuk a mykorrhiza diverzitást, akkor azt tapasztaltuk, hogy a bőséges szerves-anyag utánpótlás az Ac csoport előretörésének, a szerves anyag pótlás megvonása pedig az Aa csoport felszaporodásának kedvez. A nagy tőszám (100.000/ha) az Ad, a kisebb (70.000) pedig az Aa filotípusba tartozó

fajok dominanciáját támogatja. Az alacsony szintű tápanyag-utánpótlás a mykorrhiza populáció funkcionális diverzitásának fokozódását eredményezi.

3. Párosodási típus génektől megfosztott mutáns törzsek kompetitív képességének összehasonlítása. A párosodási típus gének (MAT) inaktiválásának hatása egyéb génekre.

Megvizsgáltuk a *MAT1-2-1* géntől megfosztott *F. proliferatum* mutánsok fenotípusát. A mutánsokról korábban azt tudtuk, hogy mesterséges táptalajon (optimális viszonyok között) ugyanúgy növekednek, mint a vad típusú szülőtörzs. Ebből a tudományos közvélemény arra következtetett, hogy a *MAT* géneknek csak az ivaros szaporodásban van szerepük. Amikor azonban szélesítettük a fenotípusos vizsgálatok körét, hogy a természet-közeli állapotokat modellezzük, s vizsgáltuk a környezeti vízakaktivitás, a növekedési hőmérséklet, a halálos hőmennyiség, az UV-sugárzás, az antagonista szervezetekkel szembeni viselkedés és a só-stressz hatását, akkor kiderült, hogy a mutánsok stressz- és antagonizmus-tűrő képessége – kis mértékben ugyan – de csökkent. A mutánsok részleges gyengesége valószínűleg áttételesen érvényesül, hiszen azt éppen mi bizonyítottuk (Keszthelyi et al.: Antonie van Leeuwenhoek 91, 373, 2007) egy korábbi OTKA pályázat keretében, hogy a *MAT* gének egy sor egyéb, a párosodásban részt nem vevő gént is szabályoznak. E gének közül beható molekuláris vizsgálatnak vetettük alá az *Fphog1*, az *Fpac1*, az *Fvwc1*, az *Fvwc2* és az *Fpnitr1* géneket, amelyek egy HOG1 típusú MAPkinázt, egy adenilát-ciklázt, a white collar komplex két fehérjéjét, valamint egy feltételezett nitriláz enzimet kódolnak. Irányított génrontással null-mutánsokat állítottunk elő ezekre a génekre és vizsgáltuk fenotípusukat.

A $\Delta Fphog1$ mutánsok fokozottan érzékenyek voltak egy sor abiotikus stresszorra, így ultraibolya sugárzásra, valamint hő-, só-, ozmózis és hidrogén-peroxid stresszre. Hiperozmózisos környezetben a mutánsok erősebb növekedésgátlást szenvedtek, mint a vad típus, továbbá romlott a konídiumok csírázási erélye, abnormális morfológiai változások történtek és fokozódott a sejtelhalás mértéke. A vad típusú génnel komplementált mutánsokban megszűnt ez a fokozott stressz-érzékenység. Ozmózisos stressz hatására a mutánsokban erőteljesebben jelentkeztek a programozott sejthalál tünetei: nőtt a reaktív oxigénformák szintje, fokozódott a mitokondrium membrán-permeabilitás, erősödött a sejtmag dezintegráció és a DNS fragmentálódás. Valós idejű kvantitatív PCR vizsgálatok igazolták, hogy az *Fphog1* nem a transzkripció szintjén szabályozódik. Ennek a génnek a stressz alkalmával jelentkező apoptózis tünetek mérséklésében van szerepe, az ivaros

szaporodásban viszont nincs. A HOG-típusú MAPkináz stresszben játszott szerepének tisztázásával sikerült logikus magyarázatot találni a $\Delta Fphog1$ mutánsok egy általunk igazolt, szokatlan és teljesen új fenotípusára, nevezetesen arra, hogy a mutánsokban nitrogén-éhezés okozta stressz hatására gyorsabban aktiválódik a fumonizin génklaszter (*FUM1*, *FUM8*), és hamarabb megindul a fumonizin B1 termelés, mint a vad típusú törzsben.

Az *Fpac1* gén 5 850 bp hosszú, adenilát ciklázt kódol, inaktiválása fokozott hő- és hidrogénperoxid-toleranciával jár csakúgy, mint a *Neurospora crassaban*. A $\Delta Fpac1$ mutánsok funkcionális elemzése során több új, az AC-mutánsok körében eddig ismeretlen fenotípust is azonosítottunk: (i) fokozódott a mutánsok nehézfémekkel (Cd, Cu) szembeni érzékenysége, (ii) gyengült endofiton kolonizációs aktivitásuk, (iii) több mint 90%-kal romlott női fertilitásuk, (iv) induktív körülmények között jelentősen fokozódott sporulációjuk, (v) megugrott bikaverin-termelésük, és (vi) megszűnt a vegetatív ön-inkompatibilitásuk. Ez utóbbi a mutánsok megnövekedett hidrogén-peroxid toleranciájával magyarázható, egyszersmind közvetett bizonyítékkal szolgál arra az általánosan elfogadott, de kísérletesen nem igazolt nézetre, amely szerint a vegetatív inkompatibilitás során a sejtek programozott, valószínűleg apoptózisos sejthalált szenvednek. (E folyamatban ugyanis reaktív oxigénformák játszanak szerepet.)

A white collar fehérjék által alkotott komplex (WCC) a kék fény érzékelésében és az arra adott válasz kialakításában játszik szerepet. Fény hatására a WCC – egy bonyolult, s nem kellően tisztázott eseménysoron keresztül – foszforilálódik, majd ebben az aktív állapotában kötődik fényindukált gének (például a cirkadián ritmust irányító gének, valamint a karotinoid szintézisért és a konidiálásért felelős gének) promóteréhez, megindítva expressziójukat. Az *Fvwc-1* és az *Fvwc-2* gének inaktiválásával 30%-kal csökkent a sporuláció, elhalványult a diurnális ciklus indukálta gyűrűs növekedés, de nem csökkent a mutánsok női fertilitása és nem gyengült növényi szöveteken mutatott kolonizációs teljesítményük sem.

Az *Fpnitr1* gén egy feltételezett nitriláz enzimet kódol, aktivitása acetónitril nitrogénforráson jelentősen megnövekszik. A $\Delta Fpnitr1$ mutánsok gyengén növekednek nitrileket és cianidokat tartalmazó tápközegben, amiből arra következtethetünk, hogy a természetben az ilyen nitrogénformákat tartalmazó szubsztrátumokon történő kolonizáció során van szükség erre az enzimre. A $\Delta Fpnitr1$ mutánsok növekedése paradicsom bogyókon jelentősen gyengült a vad típusú szülőtörzs növekedéséhez képest, ami erősíti ezt a feltételezést. Ugyanakkor a mutánsok női fertilitása nem szenvedett károsodást.

Az eddig is tudott volt, hogy a párosodási típus gének (*MAT* gének) által kódolt transzkripciós faktorok olyan géneket szabályoznak, amelyek közvetlenül vagy közvetve részt vesznek az ivaros folyamatokban: a *MAT* faktor elsődleges célgénjei feromon szintézis gének, feromon receptor gének és morfogének, amelyek a termőtest kialakításában vesznek részt. Ugyanakkor a *MAT* géneknek vannak egyéb célgénjeik is, amint azt korábbi munkánkban felvetettük, jelen OTKA pályázatban pedig igazoltuk. Ezen egyéb célgének közül ötöt vetettünk funkcionális vizsgálat alá. Kiderült, hogy az öt gén közül csupán egynek, az adenilát cikláz gének van szerepe az ivaros folyamatok szabályozásában, a másik négy, az életciklus egyéb eseményeit kontrollálja: stressz-választ, másodlagos anyagcseretermékek szintézisét, ivartalan sporulációt és növényi szövetekben való terjeszkedést. A *MAT* gének tehát azért működnek a csak ivartalanul szaporodó gombákban is, illetve az ivaros szaporodó gombák ivartalan életszakaszában, mert az ivaros szaporodással össze nem függő, de a gombák életében fontos folyamatokat szabályoznak.

Járványos körülmények között (de mesterséges táptalajon, optimális feltételek között fenntartott tenyészetekben is) tartósan felfüggesztik a gombák ivaros szaporodásukat, mert ezzel támogathatják a gyors, *r*-stratégista vegetatív szaporodást. Ez a felfüggesztés bizonyos esetekben teljes populációkat érintő nő-sterilitás kiépülésével jár, ami különös szegregációhoz, *sibling* populációk, majd új fajok megjelenéséhez vezet. Ezt a jelenséget a *Fusarium subglutinans* kukoricán élő európai populációjában értük tetten. Százegy, Európa különböző körzeteiből származó *F. subglutinans* törzset molekuláris polimorfizmus vizsgálatnak vetettünk alá: konzervatív hiszton H3 és β -tubulin szekvenciákban kerestünk restrikciós fragmenthossz polimorfizmusokat (RFLP). Megállapítottuk, hogy a növénykórtani, morfológiai és élettani szempontból egységesnek tűnő *F. subglutinans* két, egymástól genetikailag izolált csoportra osztható RFLP markerek alapján. A G1 (Group 1) alcsoportba 62, a G2 alcsoportba pedig 39 izolátum került; az első csoport tagjai 10-532 $\mu\text{g/g}$ beauvericint termeltek, a második csoport tagjai viszont egyáltalán nem szintetizálták ezt a mikotoxint. Előzetes vizsgálatok szerint az enniatin-szintáz gén jelentős deléciókat szenvedett a G2 csoportba tartozó törzsekben, s ez a hiba – a két csoport közötti ivaros átjárhatóság hiányában – konzerválódott.

4. A mykorrhiza-kolonizáció valamint a Fusarium-fajok előfordulásának felmérése hagyományos és GM-kukoricanövények gyökérzetében.

A program benyújtásakor elképzelhetetlennek tűnt, hogy 2007-2008-ban is ennyire nehéz lesz Magyarországon GMO növényekkel kísérleteket folytatni és a GMO mintákat szállítani, elemezni. Egészen elképesztő, itt nem részletezhető megoldásokra kényszerültünk, de így sem tudtuk a megfelelő mintaszámot biztosítani. A rendelkezésünkre álló minták alapján azonban a következő megállapításokat tehetjük: (i) mind a hagyományos, mind a GMO kukorica gyökérmintákban *Glomus* és *Gigaspora* mykorrhiza-fajok fordulnak elő; (ii) gyökérfestéses eljárással igazoltuk, hogy a gyökérkolonizáció mértéke általosan 32%-os, és nem volt különbség e tekintetben a hagyományos és a GMO növények között; (iii) GMO kukoricanövények gyökérzetében nem sikerült fajspecifikus PCR-vizsgálattal kimutatni sem a *F. proliferatumot*, sem a *F. verticillioidest* (pedig a módszer 0.0004 ng DNS detektálására alkalmas!), de az azonos területről gyűjtött nem-GMO növények gyökereiben sem fordultak elő ezek a kórokozók. Az eredmények közzléséhez azonban további vizsgálatokra lesz szükség.

5. Extrakromoszómás genetikai elemek hatása a kukorica csőpenész kórokozóinak agresszivitására.

Egy 184 törzsből álló *F. proliferatum* gyűjteményt vizsgáltunk extrakromoszómás örökletes elemek jelenlétére. A gombák eltérő földrajzi régiókból (a Perzsa-öböltől Európán át Észak-Amerikáig) mintegy 20 különböző gazdanövényről származtak. Hét, pálmafákról gyűjtött izolátumban fordult elő ugyanaz a plazmid, amelynek elvégeztük részletes molekuláris és biológiai elemzését. A pFP1 10.3 kb nagyságú, lineáris, a mitokondriumban lokalizált DNS-plazmid, két végét egy 400 bp hosszú fordított repetitív szekvencia és fehérje sapka védi. A plazmidon két, nem átfedő, ellentétes szálon elhelyezkedő nyitott leolvasási keret (ORF) található, amely egy fág-típusú RNS polimerázt, illetve egy a B-családba tartozó DNS polimerázt kódol. Egy tovább, kis ORF-t is sikerült azonosítani, erről egy erősen bázikus fehérje volt származtatható. RT-PCR vizsgálatok szerint a pFP1 mitokondrium számra viszonyított kópiaszáma 1.8-3.1 között változik. Ethidium-bromid kezeléssel és ismételt monospórázással sikerült plazmidmentes vonalakat szelektálni. A plazmid-irtás azonban nem járt fenotípusos változásokkal, a törzsek növekedési erélye nem változott, női fertilitásukat pedig nem nyerték vissza. A pFP1 – fenotípusos hatását tekintve – kriptikus plazmid, amely

nem régi, de terjedőben levő jövevénynek tekinthető a *F. proliferatum*-ban. Terjedése valószínűleg ivaros úton történik a megtermékenyítésül szolgáló, hímként funkcionáló mikrokonídiumok révén. (Az átvitel akkor is megvalósulhat, ha a párosodási kísérlet valójában eredménytelen.) Jelenleg nem tudjuk bizonyítani, hogy a plazmidot hordozó törzsek fitnessze és patogenitása csökkenne, bár ez nagyon valószínű, mert plazmidhordozó *F. proliferatum* törzsek a természetben csak nagyon kedvező élőhelyen maradtak fenn: pálmalevélen, mediterrán, illetve szubtrópusi viszonyok között.

6. Hasznos transzgén beépítése a búzanemesítési anyagba hagyományos módszerek felhasználásával

Előzmények, anyag és módszer

A modellkísérletként szolgáló részfeladat alapvető célkitűzései az alábbiak voltak: (1) a genetikailag módosított szervezetek nemesítésben történő felhasználásának tanulmányozása, (2) a géntechnológiával beépített tulajdonság stabilitásának vizsgálata az ivaros keresztezések során, valamint (3) új nemesítési alapanyagok előállítása. A modell kísérletünkhöz olyan, az aestivum búzából származó célgént kerestünk, amely a nemesítés szempontjából az egyik legfontosabb tulajdonságot, a sütőipari minőséget befolyásolja. Választásunk a búzaszem tartalék fehérjéi közül az 1Ax1 nagy molekula tömegű glutenin alegységet kódoló génre esett, amelyet a Rothamsted Kutatóintézetben génkonstrukciós vektorokba építve biolisztikus transformációs eljárással jutattak az Imp tavaszi búzafajtába. Vizsgálatainkhoz két transzgénikus vonalat választottunk ki, amelyek stabilan hordozták az 1Ax1-es alegységet kódoló gént és a fehérje termelődés is kimutatható volt. Ezek közül a T1 vonal 2 kópiában, míg a T2 vonal 1 kópiában tartalmazta a transzgént. A transzgénikus vonalakat 2, a Pannon Prémium fajtacsoportba tartozó martonvásári őszi búza fajtával kereszteztük, amelyek közül az Mv Suba siker minősége kiemelkedő, lisztjavításra is alkalmas, míg az Mv Mazurka nagy fehérje és sikértartalmú fajta.

Két BC₁ kombinációt választottunk ki a részletes módszertani, fehérje és morfológiai vizsgálatokra: T1/Suba//Mazurka (kód jele: 180), és a T2/Suba//T2/Mazurka (kód jele: 190).

Mindkét kombináció esetében hasonló kísérleti sémát alkalmaztunk: félszem mag módszerrel (csíráztatás előtt a szemek csírát nem tartalmazó felét tartalékfehérje vizsgálat céljaira levágtuk) meghatároztuk az egyedi BC₁F₁ növények tartalékfehérje összetételét és az Ax1 alegység jelenlétét. A pozitív egyedeket (Ax1 fehérje tartalmú) kiválasztva, azokról részben portok tenyészeteket indítottunk, részben a termésüket betakarítottuk. BC₁F₁ növényenként 25

– 30 szemet a BC_1F_2 kísérletbe vontunk az $1Ax1$ alegység jelenlétének meghatározása és a homozigóta vonalak azonosítása céljából. A két BC_1F_2 populáció felszaporítására és értékelésére kontrollált klímakamrás kísérletekben került sor. A BC_1F_2 nemzedék pozitív egyedeiről ismételtelen portok tenyésztést indítottunk, valamint a 180-as kombináció pozitív egyedeinek egy részét visszakeresztettük az Mv Suba vagy az Mv Mazurka fajtákkal, létrehozva a BC_2 nemzedéket, amelyben az $1Ax1$ fehérje jelenlétét szintén ellenőriztük. A BC_1F_2 vonalak betakarított termését hatósági engedélyeztetés után 2008 őszén szántóföldre kivetettük (BC_1F_3) alapvető agronómiai tulajdonságaik elemzése és megszaporítás céljából oly módon, hogy a vonalak egyedi növényeinek termését külön-külön egy-egy kalászutód sorba vetettük. A BC_1F_3 nemzedék aratása után kellő mennyiségű magmintával rendelkezünk majd a minőségi paraméterek vizsgálatához is, amely választ adhat arra, hogy milyen módon befolyásolja a transzgenikus eredetű $1Ax1$ alegység a minőségi paramétereket őszi búza genetikai háttérben. A portok tenyésztést korábbi munkánk során kidolgoztuk, a nagy molekula tömegű tartalék fehérjék SDS-PAGE elválasztását Jackson és munkatársai módszerei alapján végzetük.

BC1 populációk jellemzése.

A BC_1 visszakeresztést követően a 180-as populáció esetében 30 BC_1F_0 szemből indultunk ki, amelyből 15 (50%) hordozta az $1Ax1$ alegységet. Ebből 5 növény csíranövény korban elpusztult, további 4 növény a vernalizációs kezelés ellenére fűszerű maradt és nem kalászott ki. Így a további vizsgálatokat összesen 6 BC_1F_1 növény utódvonalával végeztük. A 190-es populáció esetében 35 szemből indultunk ki, amelyből 15 szem (43%) tartalmazta az $1Ax1$ alegységet. Ebből 3 csíranövény korban elpusztult, 2 a vernalizációs kezelés ellenére fűszerű maradt, 10 BC_1F_1 növény utódvonalainak további vizsgálatát téve lehetővé. Habár a BC_1F_1 növények mindegyike tartalmazta az $1Ax1$ alegységet, a BC_1F_2 vonalakra a fehérje alegység kimutathatóságának széles variabilitása volt a jellemző. A 180-as populáció 6 vonala közül 2-re az $1Ax1$ alegység jelenléte homozigóta formában volt a jellemző, a többi 4 vonalban a gyakoriság 68 – 84% között mozgott. A 190-es populáció 10 BC_1F_2 vonala közül a transzgen fehérjéjére nézve 2 homozigóta pozitív, 2 homozigóta negatív volt, míg a maradék 6 vonalban a fehérje alegység gyakorisága 33 – 93% között mozgott. Hasonlóan a BC_1F_1 nemzedékhez, mindkét BC_1F_2 populációra jellemző volt a változó arányú csíranövény pusztulás, valamint a kikalászolni képtelen növényegyedek megjelenése, amely azonban nem volt kimutatható a kontrollként vizsgált szülőfajták egyikében sem. A csíranövény pusztulás átlagos aránya a 180-as populációban 29%-os volt, a 6 vonal közti 16 – 40%-os intervallummal. Ugyanezen

értékek a 190-es populációban 32% átlaggal és 17 – 97%-os intervallummal voltak mérhetőek. A ki nem kalászott növények átlagos gyakorisága a 180-as populációban 18% (0 – 50%-os vonalankénti intervallummal), a 190-es populációban 14% volt (0 – 100%-os intervallummal). Egyik esetben sem volt azonban kimutatható összefüggés a transzgén fehérje jelenléte, valamint a csíranövény pusztulás és a fűszerű növekedési típus között.

A két BC₁F₂ populációban az 1Ax1 fehérje alegységre homozigóta 4 vonal néhány növény termelési biológiai paramétereit meghatározva előzetesen megállapítható, hogy ezek a vonalak fertilitásukban és termékenységükben nem térnek el jelentősen az őszi búza szülőktől (1. táblázat). A 180-as kombináció 2 vonalának csökkent szemtermése elsősorban az alacsonyabb produktív hajtás számnak volt köszönhető. E vonalak agronómiai tulajdonságainak vizsgálata szántóföldi tesztelésben folytatódik.

1. táblázat. Az 1Ax1 fehérje alegységre homozigóta BC₁F₂ vonalak növény morfológiai és termelési biológiai paramétereit az őszi búzaszülők átlagához viszonyítva kontrollált klímakamrás kísérletben.

Tulajdonságok	T1/Suba//Mazurka homozigóta 1Ax1 BC ₁ F ₂ vonalak átlagértékei az őszi búza szülők átlagához viszonyítva (%)		T2/Suba//T2/Mazurka homozigóta 1Ax1 BC ₁ F ₂ vonalak átlagértékei az őszi búza szülők átlagához viszonyítva (%)	
	x17	x20	x6	x7
	Kalászosítás	114	177	128
Növénymagasság	109	89	141	120
Produktív hajtások	77	74	100	110
Kalász hossz	106	111	126	121
Átlag szemszám	97	106	122	104
Ezerszem tömeg	95	93	84	119
Növény szemtermés	82	85	110	145

A *portoktenyésztés* alacsony hatékonyságúnak bizonyult mindkét populációban, amelynek elsődleges oka a 180-as populációban az alacsony embrió indukciós gyakoriság, míg a 190-es populációban az alacsony zöld növény regenerációs gyakoriság volt (2. táblázat). A két populációból összesen 12 db fertilis DH vonalat nyertünk, ezek közül azonban csak 1 DH vonal tartalmazta homozigóta formában az 1Ax1 alegységet.

2. táblázat: A két BC populáció portok tenyésztésének hatékonysága

Populáció	Lerakott portok (db)	Embrió indukció (%)	Összes növény regen (%)	Zöld növény regen (%)	Fertilis DH ₀ növény (db)	1Ax1 alegységet hordozó (db)
180 BC ₁ F ₁	720	6,7	45,8	10,4	2	0
180 BC ₁ F ₂	1000	5,9	28,8	5,1	3	1
190 BC ₁ F ₁	5223	34,3	28,2	1,6	6	0
190 BC ₁ F ₂	4485	46,1	28,6	0,4	1	0

BC₂ nemzedék jellemzése.

A 180-as populációban, amely a transzgént 2 kópiában tartalmazó törzs keresztezéséből származott, a BC₁F₂ vonalak transzgén fehérjére pozitív növényeinek egy részét visszakeresztettük az Mv Suba vagy az Mv Mazurka fajtákkal, összesen 14 növényt. Az így

kapott 196 BC₂F₀ szem 54%-ában volt kimutatható az 1Ax1 fehérje alegység. Annak ellenére, hogy a BC₁F₂ vonalak legalább 68%-ban tartalmazták az 1Ax1-et, 2 BC₂ növényről aratott 21 – 25 szem egyikében sem volt kimutatható a transzgén fehérje. Az *x17* homozigóta pozitív vonalból keresztezett 3 növény BC₂F₂ szemtermésének mindegyikében jelen volt a fehérje alegység, míg az *x20* vonal 2 keresztezett növényének szemei közül egyik 100%-ban, a másik 50%-ban tartalmazta a fehérje alegységet. A BC₂F₁ növények felnevelése és szemtermésük ellenőrzése folyamatban van.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a transzgénikus vonalba stabilan beépült és aktívan működő transzgén a későbbi ivaros keresztezések során a heterozigóta állapot következtében ismét labilissá válhat, amely kromoszóma szerkezeti átrendeződéseket válthat ki, és a transzgén elcsendesítését eredményezheti. Ezt támaszthatja alá a portok tenyésztés alacsony hatékonysága, amely különösen a növény regeneráció jelentős csökkenésében fejeződött ki, valamint a hasadási arányokban megfigyel kisebb-nagyobb anomáliák. Ennek ellenére még ebben a viszonylag kis számú vizsgálatban is sikerült a különböző hagyományos nemesítési módszerekkel a transzgén átvitele, amely új nemesítési alapanyag létrehozásához vezetett.

Továbbiakban tervezzük a BC₁F₂, valamint a BC₂F₁ növényekről begyűjtött DNS minták HMW alegység specifikus primerekkel történő tesztelését, annak megállapítása érdekében, hogy az 1Ax1 fehérje eltűnése egyes genotípusban a transzgén elcsendesítése vagy a gén kiesése folytán következett-e be. Emellett a BC₁F₃ szántóföldi szaporítását követően sor kerül e tételek minőségi vizsgálatára is. Ezeknek a kiegészítő információknak összegyűjtésével tervezzük az eredmények tudományos folyóiratokban való megjelentetését.

7. Bioenergia célra ültetett növények terméseredményeit befolyásoló víruskórokozók elterjedésének vizsgálata a hazai flórában előforduló vírusizolátumok molekuláris jellemzése

a., Kukorica csíkos mozaik vírus (MDMV) populációk molekuláris analízise.

A hazai kukoricatermesztés egyrésze a jövőben a bioetanol gyártás céljaira kerülhet felhasználásra, mely termesztés eredményességét nagy mértékben befolyásolja a kukorica csíkos mozaik vírus elterjedése mely potyvírust hazánkban már a hatvanas évek elején azonosították és azóta minden évben a jelenléte nyomoköveshető különböző mértékű kártételek mellett. A pályázat futamideje alatt két jelentős kukoricatermesztési körzetből (Dél-alföld, Szeged ill. Mezőség-Dunántúl, Martonvásár) tünetet mutató és tünetmentes kukorica, fenyércirok és szemes cirokról vírus izolátumokat nyertünk. A vírus izolátumokat

molekuláris biológiai módszerek felhasználásával jellemeztük a vírus köpenyfehérje génjét kódoló szakaszok elsődleges szerkezetének meghatározásával. A részleges szerkezet meghatározást azért a köpenyfehérje génre korlátoztuk, mert közismert, hogy a leghatékonyabb keresztvédettségi reakciót a vírus köpenyfehérje génjének gazdanövénybe való beültetésével érhetjük el. Ennek következtében a transzformált növényben szintetizálódó transzgén egy felülfertőző vírus genomjával rekombinálódhat, a vírus genom jelentősen megváltozhat. Ezen génszerkezeti technológia kockázatát a rekombinációs gyakoriság meghatározásával mérhetjük fel. A három évben elvégzett mintagyűjtésünk során közel hetven MDMV köpenyfehérje gént azonosíthattunk melyek igen nagyfokú szekvencia azonosságot mutattak. Ezen adatok alapján jelentős biológiai különbség nem mutatkozott. Az eredményeket mind magyar, mind angol nyelven, hazai és nemzetközi tudományos fórumokon valamint írott formában közzeltünk vagy a kéziratokat megjelentetésre benyújtottuk. (Az eredmények számszerűsített adatait a publikációs listában feltüntetett közlemények részletesen tartalmazzák) A három év eredményei alapján összegezve megállapítottuk, hogy a köpenyfehérje régióban nincs szekvencia diverzitás és a két földrajzilag jól elkülöníthető helyen meglévő víruspopulációkban nincs szignifikáns különbség. Az MDMV molekuláris analízisének feldolgozásában résztvevő doktorandus Gell Gyöngyvér (Szent István Egyetem) PhD. értekezésének jelentős részét fogja tartalmazni ez az elvégzett kísérletes munka.

b., Földimogyoró satnyulás vírus peanut stunt vírus PSV izolátumok jellemzése.

Hazánkban az akác az elmúlt több mint kétszáz év alatt széles körben elterjedt és a megfelelő klímának köszönhetően megtelepedett hazai flórában. Az akác népszerűségét nem csak kiváló mézélő virágának, hanem a faiparban jól felhasználható keményfájának köszönheti. Gyors növekedése alapján energia növényként is számításba vehetjük. Az akác közismerten ellenálló a különböző kórokozóknak és kártevőknek, azonban jól ismert néhány betegsége is, melyek közül a földimogyoró satnyulás vírus elterjedésére lettünk figyelmesek az elmúlt években. Ezért különböző a Pannon Ökorégióban előforduló termőhelyekről betegség tünetet mutató és tünetmentes akácról mintákat gyűjtöttünk be. Az ezen mintákban azonosított vírusok teljes elsődleges szerkezetét meghatároztuk és azokat összehasonlítottuk a nemzetközi adatbankokban megtalálható nukleinsav sorrendekkel. A szekvencia analízis során megállapítottuk, hogy az általunk azonosított PSp-RV izolátum egy új negyedik alcsoportba tartozó vírus izolátum mely természetes rekombinánsnak mutatkozott két másik alcsoportba sorolható izolátummal. Az akácról izolált földimogyoró satnyulás vírus kísérletes és

természetes gazdanövény körét jellemeztük, mely adatokat mind hazai és nemzetközi konferenciákon, mind pedig magyar és angol nyelvű írott változatait megjelentettük, vagy közlésre benyújtottuk (lásd publikációs listát). Az akácról származó PSV izolátumok molekuláris és biológia jellemzését foglalja össze a munkában doktorandusként részt vevő Kiss László (Corvinus Egyetem) írás alatt lévő PhD. értekezése.

8. Virusellenálló transzgénikus burgonya fajták virusellenállóságának meghatározása és az ellenálló képesség stabilitásának vizsgálata.

Vírusrezisztenciát kialakító plazmidkonstrukció készítése

A konstrukció készítéséhez a pRGGneo bináris vektorból indultunk ki. Ebből első lépésként eltávolítottuk a *gus* és az *nptII* géneket SacI, illetve HindIII/BamHI restriktions emésztéssel, így a létrejött pRGG plazmid a „hasznos gén” befogadására és marker-mentes transzformációra alkalmassá vált. A *gus* gén helyére a PVY^{NTN} 820 nt hosszúságú szakaszát építettük be intronnal elválasztott fordított ismétlődés (inverted repeat) formában. A beépített cDNS fragment a PVY^{NTN} CP génjének utolsó 554 nukleotidját, és a 3' nem kódoló régió (3'UTR) első 266 nukleotidját tartalmazza.

Növényi transzformáció és regeneráció, regenerációs hatékonyság az egyes fajtáknál

Öt burgonya fajtát transzformáltunk a GV3170YCP agrobaktérium-bináris vektor konstrukcióval. A Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Russet Burbank és Somogyi Kifli fajták esetében két független transzformációs kísérletben használtunk levelet explantként, míg a Gülbabánál három kísérlet végeztünk levéllel. Internódiumot Mindenesnél és Kisvárdai Rózsánál két kísérletben, Gülbabánál három kísérletben, Russet Burbanknál négy, míg Somogyi kiflinél öt kísérletben transzformáltunk

A transzformációt követő regeneráció értékelése során minden fajtára általánosan érvényes volt, hogy az első, 1-1,5 cm méretű regenerált hajtásokat a transzformációtól számított 4.-5. héten tudtuk az explantokról leválasztani, majd ezt követően még 3-5 alkalommal történt hajtásszedés kb. egyhetes időközönként.

A Mindenes fajtával végzett két független transzformációs kísérletben 200 explantot fertőzve összesen 802 hajtás regenerált. Megállapítottuk, hogy az internódium sokkal jobb explant típus, mint a levél. Ebben az esetben a regenerációs ráta elérte az 5,7 hajtást explantonként a levélen kapott 1,5 hajtással szemben.

A Kisvárdai Rózsánál két transzformációs kísérletben 590 hajtást kaptunk 200 explant fertőzése után. Ennél a fajtánál szintén az internódium adott jobb regenerációs rátát (4,0 hajtás/explant) a levélhez képest (1,5 hajtás/explant).

A Gülbabával három transzformációs kísérletet végeztünk el, amelyekben összesen 320 explanton 426 hajtás regenerálódott. Ebben az esetben is jobb regenerációs rátát adott az internódium (1,6 hajtás/expl.), mint a levél (0,8 hajtás/expl.).

A Russet Burbank és Somogyi kifli fajtáknál két transzformációs kísérlet után már csak internódiumokat transzformáltunk, mivel itt is a többi fajtához hasonlóan gyenge regenerációs rátát kaptunk levél esetén. A Russet Burbankkal elvégzett négy transzformációs kísérlet eredményeként a 458 explantumról átlagosan 1,2 hajtás regenerálódott internódiumonként, míg Somogyi kifliből öt kísérletben 1377 explantból 703 regeneránst kaptunk (0,5 hajtás/explant).

Regeneránsok tesztelése PCR-rel

A konstrukció marker-mentességéből adódóan növényi szelekcióra nem volt lehetőség, ezért a regenerált hajtásokat háromszori cefotaximos, majd egyszeri antibiotikum-mentes táptalajra való átrakás után PCR-rel teszteltük.

Az első néhány 10 hajtás YCP PCR vizsgálatainak eredményei és az egyes vonalak fenotípus adatainak összevetése után megállapítottuk, hogy a pozitív reakciót adott vonalak közül a legtöbbször megfigyelhető volt az *ipt* génnek a normálistól eltérő fenotípust okozó hatása. Ez sokféleképpen nyilvánult meg: egészen enyhe alapi kalluszos megvastagodástól a különböző fokú, ún. „shooty” fenotípusig. A „shooty” fenotípust mutató hajtások apikális dominanciája redukált, gyökeresedési képességük gyengébb volt, vagy teljesen hiányzott.

Bár az *ipt* génre a hajtásindukáló tulajdonsága miatt volt szükség a transzformációs rendszerben, a regeneráció során a fenotípusra gyakorolt hatása is meg nyilvánult, amit nem lehetett figyelmen kívül hagyni. Az *ipt* gént hordozó vonalak esetében nagyobb eséllyel volt várható az YCP transzgen beépülése, ezért a vizsgálatok egy részénél a mintaszedés során ezeket a vonalakat előnyben részesítettük. A Mindenes és Kisvárdai Rózsa esetében a mintaszedés az eltérő fenotípus alapján szelektálva történt. A Gülbaba és Russet Burbank fajtáknál szelektált és random mintaszedési módot is alkalmaztunk, míg a Somogyi kiflinél az összes regenerált hajtást megvizsgáltuk, mivel ennél a fajtánál nagyon alacsony volt a transzformációs hatékonyság. Az antibiotikum-szelekció hiánya miatt a mintaszám ebben az esetben igen nagy volt, ezért a mintákat először ötösével csoportosítottuk (pooloztuk), a poolokat teszteltük PCR-rel, végül a pozitív poolokat szétbontva egyesével vizsgáltuk a vonalakat.

A transzformációs ráta a Mindenés és Kisvárdai Rózsa fajtáknál kiemelkedően magas – 50, illetve 40% – volt, ezt követte a Russet Burbank 20, a Gülbaba 17%-kal szelektált mintaszedés esetén. Random mintaszedés után a Gülbabánál 6, a Somogyi kiflinél 4, míg a Russet Burbanknál 0,6%-os transzformációs rátát állapítottunk meg

A PCR YCP+ vonalak közül összesen 84, *in vitro* fenntartott, független vonal részletes vizsgálatát végeztük el: a vírus köpenyfehérje génen kívül az *ipt* génre és az agrobaktérium esetleges jelenlétére (kromoszomális *cheA* gén) is teszteltük ezeket. Agrobaktériumot egyik vonalból sem mutattunk ki. Újabb mintaszedés után a 84-ből 69 hasznos génre pozitív (YCP⁺) vonalat találtunk, amelyek közül 48 vonal hordozta, míg 21 vonal nem hordozta az *ipt* gént (*ipt*⁻). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a vizsgált transzgénikus vonalak átlagosan 30%-a (21 vonal) csak a hasznos gént hordozta, a növényben nem kívánatos bakteriális eredetű *ipt* gént nem.

Transzgénikus vonalak nevelése rezisztencia teszthez, r rezisztencia teszt

Az YCP⁺ burgonya vonalak rezisztencia tesztjének elvégzéséhez szükséges fiatal burgonyanövényeket kétféle módon állítottuk elő: minigumók hajtásával (Mindenés, Kisvárdai rózsa, Gülbaba és Russet Burbank fajták), illetve *in vitro* gyökereztetett hajtások (Somogyi kifli) kiültetésével.

Az YCP, *ipt* és *cheA* génekre PCR-rel vizsgált vonalak közül negyvenkettőt vontunk be a rezisztencia vizsgálatokba. A burgonyanövények inokulálása után minden esetben RT-PCR-rel végeztük a vírus kimutatását. A PVY^{NTN} az általunk vizsgált burgonyafajták hajtásain nem okozott jól látható tüneteket, ezért a rezisztencia teszt során vizuálisan csak a visszafertőzött dohánynövényeket tudtuk értékelni.

Rezisztensnek nyilvánítottuk azokat a vonalakat, amelyekről a dohányokat visszainokulálva azok szisztemikus levelein nem jelentek meg tünetek (érkivilágosodás, majd nekروزis), és a HC-Pro régióra specifikus primerpárral nem tudtunk bennük PVY-t detektálni. Az RT-PCR eredmények teljes összhangban voltak a dohány visszafertőzési kísérletek eredményeivel. A tesztelt vonalak 60%-a (a 42 vonalból 25) mutatott teljes rezisztenciát. A 25 rezisztens vonal közül 11 volt egyben marker-mentes is. A gumók felszedésekor azokon sem a rezisztens, sem a fogékonyak bizonyult vonalak esetében nem voltak láthatóak a PVY^{NTN}-re jellemző vírustünetek.

Southern analízis

A T-DNS genomba történt integrációját Southern analízissel igazoltuk hét rezisztens vonal esetében. A kiválasztott vonalak közül négy – KR5.1.5, KR4.2.31, MIN4.2.50, SK12.3.20 – teljesen normális fenotípusú volt és nem tartalmazta az *ipt* gént, míg három *ipt*⁺ volt, de ezek is közel normális fenotípust mutattak: a MIN5.1.10 hajtása valamivel gyengébb volt a normálisnál, a RUS4.1.1. alapi része megvastagodott, a GB5.3.26 pedig kevés gyökérrel rendelkezett. A p1, p2 primerek (hairpin.klónozás.ábra) által amplifikált PCR termékből készült próba a transzgénről származó PVY szekvenciát tartalmazó burgonya genomi fragmentekhez hibridizált. A T-DNS határszekvenciáin belüli két NdeI hasítóhely között egy 660 bp méretű fragment vágódik ki (hairpin.klónozás.ábra), amelyet mind a hét vonal esetében detektáltunk. Ez bizonyítja az YCPIPCY konstrukció genomba történt integrációját. A kapott nagyszámú fragment többszörös T-DNS integráció eredménye.

Hibrid PVY cDNS klónok előállítása

A munka második részében mesterséges rekombinánsokat hoztunk létre a burgonya Y vírus különböző patotípusai között, majd ezek segítségével megvizsgáltuk, hogy a PVY genom 3' végi, 1568 nt hosszú szakaszának törzsek közti cseréje milyen hatással van a fertőzőképességre és a tünetkialakításra.

Első lépésként a PVY^{NTN} és PVY^O vírustörzsek RNS genomjának 3' végét a 6s/6as primerpárral RT-PCR-rel felfozaporítottuk, majd a terméket pGEMT-Easy vektorba klónoztuk. Ezután a fragmentet BglII/KpnI restrikciós hasítással kiemeltük a plazmidból és ligáltuk a hasonlóan emésztett SPH83'pA plazmiddal, amely a PVY-N605 4066. nt és a polyA vég közötti 3' darabját hordozza. A SPH83'pA plazmidban a PVY^N BglII/KpnI szakaszát helyettesítettük a másik két törzs megfelelő szakaszával, ami az SPH83'pA-NTN és SPH83'pA-O szubklónokat eredményezte. Végül a szubklónok BstXI/KpnI fragmentjeit az ugyanígy emésztett PVY-N605(123) teljes klón megfelelő részével ligáltuk.

Ez utóbbi lépéssel egyúttal a teljes klónból eltávolítottuk a harmadik intront. Az így létrehozott PVY-N/NTN és PVY-N/O hibrid cDNS klónok, majd a kialakuló virionok is a PVY^{NTN} illetve a PVY^O törzsek N1b kódoló régiójának utolsó 436 nukleotidját, a teljes köpenyfehérje kódoló régiót és a 3' UTR-t tartalmazták PVY^N háttérben.

A fertőzőképesség vizsgálata, szekvenciavizsgálatok

A hibrid cDNS klónok elkészítése után mindenekelőtt azok működőképességének vizsgálatára volt szükség, amit *Nicotiana benthamiana* növényeken végeztünk. A PVY-N/NTN hibriddel

öt, a PVY-N/O hibriddel három biológiai inokulációs kísérletet végeztünk el. Minden esetben párhuzamosan a PVY-N605(123) cDNS klónnal is inokuláltunk növényeket. Az ELISA tesztek során a PVY-N605(123)-mal (kontroll) inokulált 15 *N. benthamiana* növény közül két hét után 11-nél (73%) kaptunk pozitív eredményt. PVY-N/NTN-nel összesen 23 növényt inokuláltunk, amelyek közül 12-ből (52%) mutattuk ki a vírust, a PVY-N/O-val inokulált 12 növényből pedig egy esetben (8%) történt szisztemizálódás. Az első fertőzés kialakulása után mechanikai inokulálással való továbbfertőzések során azonban már 100%-os szisztemizálódást tapasztaltunk.

Először a hibrid PVY klónok készítéséhez használt PVY^{NTN} és PVY^O pGEMT-Easy vektorba klónozott cDNS fragmentek szekvencia analízisét végeztük el. A DSMZ adatai alapján a felhasznált PVY^{NTN} egy Horváth J. névelvel jelzett magyar izolátum volt, ezért feltételeztük, hogy szekvenciája a Thole V. kandidátusi értekezésében közölt szekvenciához áll legközelebb, (GenBank accession nr. M95491). A szekvenciák illesztésekor kapott eredmény alapján az általunk használt PVY^{NTN} esetében a kicserélt régióban 8 nukleotid különbség volt a génbanki szekvenciához képest, amely az N1b kicserélt régiójában X, míg a köpenyfehérje aminosavösszetételében két cserét eredményezett.

A vírusok megkülönböztetése egyes genomszakaszok RFLP mintázata alapján

A gazdanövényteszt során a kísérleteket többször ismételtük, és sok esetben időben nem egyszerre vizsgáltunk minden növényfajt. A fenntartáshoz használt *N. benthamiana*-ban vagy a gazdanövényteszt során vizsgált különböző fajokban detektált vírusokat RT-PCR-t követő specifikus restrikciós emésztéssel ellenőriztük. Ehhez szekvenciaanalízis alapján az MseI enzimet választottuk ki, ami lehetővé tette a 3 szülői vírus megkülönböztetését, valamint a szülői és a hibrid vírusok elkülönítését.

A CP8503_for és CP9701_rev primerekkel amplifikált 1200 bp hosszú CP+3'UTR fragment MseI enzimes hasítása után az öt vírus esetén háromféle eredményt kaptunk: a PVY^{NTN} és PVY-N/NTN ugyanazt a (x,y,z) méretű fragmenteket adta, a PVY^O és PVY-N/O-t (a,b,c,) fragmentekre hasította, míg a PVY^N által fertőzött növény esetén egy (1,2, és 3) méretű terméket kaptunk.

A HC-Pro régió 760 bp-nyi szakaszának amplifikálása és a termék emésztése után a PVY^N és a két hibrid esetében a restrikciós mintázat azonos (x,y, fragmentek) volt, míg a PVY^O és PVY^{NTN} is más-más mintázatokat mutatott (fragmentek).

Transzformáns burgonyavonalak rezisztencia vizsgálata hibrid vírusokkal

Megvizsgáltuk a PVY^{NTN} szekvenciát tartalmazó hairpin konstrukció által indukált rezisztencia hatékonyságát a két másik törzs, illetve az általunk előállított rekombináns vírusok ellen. A kísérletbe bevont három transzgenikus burgonya vonal a munka korábbi részében stabil rezisztenciát mutatott a PVY^{NTN} ellen. Az ebben a kísérletben öt vírussal inokulált transzgenikus vonalak közül az RT-PCR eredmények alapján mind rezisztens volt. A kontroll, nem transzgenikus növények 97%-ban fertőződtek a vad típusú vírusokkal, míg a hibrid vírusokkal inokulálva őket a Mindenes fajta csak 40 (PVY-N/NTN) ill. 50%-ban (PVY-N/O) fertőződött – a többi burgonya fajta ezzel szemben teljesen fogékony volt ezekre is. Három transzgenikus burgonya vonal és kontrollként négy, nem transzformált fajta növényházi fertőzési kísérletének eredményei 3 szülői és két rekombináns PVY törzssel. A táblázat két kísérlet összesített adatait tartalmazza.

Vírustörzsek	Fertőzött növények/inokulált növények (Transzgenikus vonalak)			Fertőzött növények/inokulált növények (Kontroll fajták)			
	G 4.2.31*	M 5.1.62	M 4.2.50	MIN	KR	GB	RB
PVY ^N	0/5	0/4	0/4	7/10	3/3	3/3	3/3
PVY ^{NTN}	0/5	0/4	0/4	3/3	2/2	2/2	2/2
PVY ^O	0/5	0/5	0/5	9/10	8/8	2/3	2/2
PVY-N/NTN	0/5	0/5	0/5	4/10	8/8	3/3	3/3
PVY-N/O	0/5	0/5	0/4	5/10	7/8	3/3	5/5

* G 4.2.31: transzgenikus Gülbaba vonal, M 5.1.62, M 4.2.50: transzgenikus Mindenes vonalak; MIN, KR, GB, RB: Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba és Russet Burbank nem transzformált kontroll fajták.

illetve PVY^{N/O} (N-Wilga) génbanki szekvenciát (AJ585196, EF026074, AJ890350, AM113988), ami alapján az általunk szekvenált genomrészlet 99% hasonlóságot mutatott ezekkel az izolátumokkal.

Számos passzálás után – kb. másfél-két év elteltével – a hibrid vírusok CP és 3'UTR régióit újra szekvenáltattuk és összehasonlítottuk az eredeti szekvenciaadatokkal. Megállapítottuk, hogy a PVY-N/NTN hibrid említett régiójában két nukleotidcsere történt (nt 8604 T/G és nt

8607 G/A), amely azonban nem eredményezett aminosavcsereét. A PVY-N/O kiméra ugyanezen genomi régiójában nem történt nukleotidcsere.

Gazdanövény teszt

A különböző PVY törzsek és mesterséges hibridek tünetkialakítását hat, a *Solanaceae* családba tartozó gazdanövény fajon vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy mindegyik vírus szisztemikusan fertőzte mindegyik vizsgált növényfajt.

A *N. benthamiana* növényeken mindegyik vírus levéldeformálódást, a PVY^{NTN} pedig ezen kívül még törpülést is okozott. A *N. tabacum* cv. Xanthi esetén a vírusok először érkivilágosodást, majd nekrozist okoztak, ami törpüléssel is együtt járt. Kivétel itt a PVY^O volt, amely enyhe mozaikosodást idézett elő. A *N. glutinosa* teszt növények levelei tünetmentesek maradtak, vagy amennyiben megjelentek rajtuk tünetek, akkor enyhén ráncosodtak, deformálódtak. Ettől eltérő, mozaikos tüneteket csak a PVY^{NTN} okozott. A burgonya (*S. tuberosum* cv. Russet Burbank) nem mutatott levéltüneteket a legtöbb vírusnál, csak a PVY^O hatására jelentek meg foltos-mozaikos szimptomák. A *P. pubescens* esetében egy kicsit árnyaltabb képet kaptunk: a PVY^N, PVY^{NTN} és PVY-N/NTN egyértelmű mozaikosságot indukált, emellett a PVY^{NTN} hatására kisebb mértékű törpülés is bekövetkezett. A PVY^O és az N/O hibrid ezen a fajon szintén mozaikosodást idézett elő, de ez jóval enyhébb volt, mint amit a többi vírus okozott. A *P. floridana* PVY^{NTN}-nel inokulálva a *P. pubescens*hez hasonlóan egyértelmű mozaikot mutatott, míg PVY^N-nel vagy PVY-N/NTN-nel fertőzve általában alig látható, de hasonló tüneteket produkált. A két, O szekvenciát hordozó vírus viszont először klorotikus foltokat indukált, amelyek később nekrotizálódtak. A PVY^O és a PVY N/O szinte teljesen egyforma tüneteket alakított ki, mindössze némi időbeli késést észleltünk a hibridnél. Öt növényfaj esetében tehát a legtöbb vírustörzs egy-egy fajon ugyanolyan tüneteket indukált, és csak egy vírus okozott a többihez képest eltérő szimptomákat.

Transzgén kimutatása kromoszóma szinten

Burgonya Y vírussal transzformált *Solanum tuberosum* vonalaktól a transzgén elhelyezkedését és kópiaszámának meghatározását tűztük ki célul. Fluorescence in situ hibridizációs (FISH) módszert alkalmaztunk diploid burgonya vonalakon. BAC DNS-eket (Bacterial Artificial Chromosome) használtunk próbaként és ezeket hibridizáltuk a kromoszómák pachytene fázisára. Kiindulási anyagként üvegházban nevelt palánták portokjait gyűjtöttük, majd fixáltuk Carnoy oldatban (ecetsav:etanol = 3:1). Ezt pár nap, vagy

hét múlva lecseréltük 70 %-os etanolra, hogy a portokok puhábbak maradjanak. A portokokból lemezpreparátumokat készítettünk enzimkezeléssel (cellulase:pectolyase:helicase=1:1:1), majd extrafixáltuk 1 %-os formaldehid oldatban. Erre azért volt szükség, mert különben a kromoszómák olyan mértékben sérülnek a FISH kísérletek alatt, hogy értékelhetetlen eredményeket kapunk. A BAC-okból a DNS izolálását a hagyományos alkáli sóoldatos extrakcióval és fenol kloroformos tisztítással végeztük. Miután néhány BAC DNS tartalmazott ismétléseket, így szükségessé vált genomi DNS izolálása, majd abból Cot100 kinyerése. Ezt az ismétlődő szekvenciák blokkolására használtuk. A Cot100 a koncentráció és az idő függvényében létrehozandó DNS szakasz, mely blokkolja a teljes heterokromatin és részben az eukromatin repetitív részeit. A próbákat nick-transzlációval jelöltük. Indirekt jelölést alkalmaztunk, mert így lehetőségünk nyílt a detektálás amplifikálására. A biotinnal jelölt próbákat Avidin Texas Reddel és biotinylated anti-Avidinnel detektáltuk. A digoxigenin jelölt próbákat sheep anti-digoxigenin FITC, majd Anti-sheep FITC-vel végeztük. Ez lehetővé tette a jobb láthatóságot. Kísérleteinkben a FISH kritikus kérdései voltak a BAC DNS és az ebből készített próbák minősége, továbbá a lemezpreparátumok citoplazma fedettsége. Összefoglalva, minden BAC-ot sikeresen hibridizáltunk a kromoszómákhoz és pachytene kromoszómákon a transzgén elhelyezkedésének vizsgálatához a módszert megvalósíthatónak találtuk.