ELLENÁLLÓSÁG KIALAKÍTÁSA A BURGONYA Y VÍRUS (PVY) KÜLÖNBÖZŐ TÖRZSEI ÉS MESTERSÉGES HIBRIDJEI ELLEN BURGONYÁBAN SHOOTER MUTÁNS AGROBAKTÉRIUMON ALAPULÓ TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZERBEN

Doktori (Ph.D.) értekezés

BUKOVINSZKI ÁGNES

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna

Kísérletes Növénybiológia Doktori Program
Programvezető: Prof. Dr. Szigeti Zoltán

Témavezető: Prof. Dr. Balázs Ervin
Kutató professzor, az MTA rendes tagja

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

2008

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLOK 7

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9

2.1. A burgonya jelentősége 9

2.2. A burgonya betegségei 11

2.3. A PVY rendszertani besorolása és jellemzése 13
2.3.1. A genom felépítése és a géntermékek funkciói 14
2.3.2. A tünetkialakításban szerepet játszó genomi régiók 16
2.3.3. Törzsek, izolátumok 17

2.4. Vírusok elleni rezisztencia kialakítása 19
2.4.1. Molekuláris módszerekkel kiváltott ellenállóképesség 20
2.4.1.1. Fehérje által közvetített rezisztencia 21
2.4.1.2. RNS-ek által közvetített rezisztencia 22
2.4.2. A vírusgének transzgénként való felhasználásának kockázati tényezői 23

2.5. Fertőzőképes cDNS klónok alkalmazása 24

2.6. Növényi transzformációs rendszerek 25
2.6.1. Szelekciós markerek és riporter gének 25
2.6.2. Markergének eliminálása 26
2.6.3. A burgonya transzformációja és regenerációja 27
2.6.4. A hajtásregenerációt serkentő gének szerepe a marker mentes transzformációban 29

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 31

3.1. Anyagok és módszerek transzgénikus, PVY rezisztens burgonyavonalak előállításához . 31
3.1.1. Baktérium törzsek, plazmidok, vírustörzs 31
3.1.2. Molekuláris biológiai anyagok, módszerek 31
3.1.2.1. Primerek 31
3.1.2.2. Növényi transzformációs vektor készítése 32
3.1.2.4. RNS izolálás vírusfertőzött növényből 33
3.1.2.5. Regenerált hajtások vizsgálata PCR-rel 33
3.1.2.6. Víruskimutatás RT-PCR-rel 33
3.1.2.7. A transzgén genomi integrációjának vizsgálata Southern analízissel 34
3.1.3. Növényi anyagok, módszerek 34
3.1.3.1. Növényi anyag 34
3.1.3.2. Növények fenntartása steril tenyészetben 34
3.1.3.3. Növényi transzformáció és regeneráció 35
3.1.3.4. Transzformáns növények nevelése rezisztencia teszthez 35
3.1.3.4.1. Minigumó indukciós kísérletek 36
3.1.3.4.2. Palántanevelés 36
3.1.4. Virológiai anyagok, módszerek rezisztenciavizsgálathoz 36
3.1.4.1. Vírustörzs 36
3.1.4.2. Transzformáns növények fertőzése PVY-nal 37
3.1.4.3. A vírus kimutatása, vírusrezisztencia igazolása 37

3.2. Anyagok és módszerek hibrid PVY klónok előállításához és vizsgálatához 37
3.2.1. Baktérium, vírusok 37
3.2.2. Molekuláris biológiai anyagok, módszerek 37

3.2.2.1. Plazmidok, klónozási technikák ... 37
3.2.2.2. RNS izolálás ... 38
3.2.2.3. RT-PCR ... 38
3.2.2.4. Vírusok azonosítása restrikciós emésztéssel ... 38
3.2.2.5. DNS szekvenálás ... 39
3.2.3. A hibrid PVY klónok fertőzőképességének vizsgálata ... 39
3.2.3.1. DAS-ELISA ... 39
3.2.4. Növényi anyagok, módszerek ... 40
3.2.4.1. Gazdanövény teszthez használt növényfajok és fajták ... 40
3.2.4.2. Gazdanövény teszt ... 40
3.2.4.3. Transzformáns burgonyavonalak rezisztencia vizsgálata ... 40
3.3. Táptalajok, antibiotikumok ... 40
4. EREDMÉNYEK ... 43
4.1. Transzgénikus burgonyavonalak előállítása ... 43
4.1.1. Vírusrezisztenciát kialakító plazmidkonstrukció készítése ... 43
4.1.2. Növényi transzformáció és regeneráció ... 45
4.1.2.1. Regenerációs hatékonyság az egyes fajtáknál ... 45
4.1.2.2. Regeneránsok tesztelése PCR-rel ... 47
4.1.3. Transzgénikus vonalak nevelése rezisztencia teszthez ... 49
4.1.3.1. Minigumó indukálás ... 50
4.1.3.2. Palántanevelés ... 51
4.1.4. Rezisztencia teszt ... 51
4.1.5. Southern analízis ... 52
4.2. Hibrid PVY klónok előállítása és vizsgálata ... 54
4.2.1. Hibrid PVY cDNS klónok előállítása ... 54
4.2.2. A fertőzőképesség vizsgálata ... 54
4.2.3. Szekvenciavizsgálatok ... 56
4.2.4. Gazdanövény teszt ... 57
4.2.5. A vírusok megkülönböztetése egyes genomszakaszok RFLP mintázata alapján ... 58
4.2.6. Transzformáns burgonyavonalak rezisztencia vizsgálata különböző vírustörzsekkel ... 60
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ... 62
5.1. Transzgénikus burgonyavonalak előállítása ... 62
5.2. Hibrid PVY klónok előállítása és a rekombináns vírusok vizsgálata tesztnövényeken és transzformáns burgonyavonalakon ... 66
6. ÖSSZEFOGLALÁS ... 70
7. SUMMARY ... 71
MELLÉKLETEK ... 72
A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE ... 76
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 77
IRODALOMJEGYZÉK ... 78

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATP - adenozin trifoszfát
bar - foszfinotricin acetiltranszferáz gén
bp - bázispár
cDNS - komplementer DNS
cheA - a CheA kemotaxis fehérjét kódoló bakteriális, kromoszomális gén
CI - citoplazmikus zárványfehérje
CP - coat protein, köpenyfehérje
CTAB - cetil-dimetil-etil-ammónium-bromid
dsRNS - double stranded, duplaszálú RNS
DSMZ - Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Németországi mikroorganizmus és sejtkultúra gyűjtemény
EPSP - 5-enolpiruvilsikimát-3-foszfát szintáz
ER - extrém rezisztencia
ESP - extreme shooty phenotype, extrém shooty fenotípus
EU - Európai Unió
GFP - green fluorescent protein, zöld fluorescens protein
GM - genetikailag módosított
gusA - β-glükuronidáz gén
HC-Pro - helper komponens proteináz
hpt - higromicin foszfotranszferáz gén
HR - hiperszenzitív reakció v. rezisztencia
ipt - izopentenil foszfotranszferáz gén
LUC - luciferáz enzim
miRNS - mikro RNS
MP - movement protein, mozgási fehérje
mRNS - messenger, hírvivő RNS
nptII - neomicin foszfotranszferáz gén
nt - nukleotid
NTR - nontranslated region, nem transzlálódó régió
ORF - open reading frame, nyitott leolvasási keret
PCR - polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PEG - polietilén glikol
PTGS - posttranscriptional gene silencing, poszttranszkripcionális géncsendesítés
PTNRD - potato tuber necrotic ringspot disease, burgonya gumó nekrotikus gyűrűsfoltosság
RFLP - restriction fragment length polymorphism
RISC - RNS-indukált silencing komplex
RNAi - RNS interferencia
siRNS - short interfering, rövid interferáló RNS
ssRNS - single stranded, egyszálú RNS
T-DNS - transzfer DNS

Vírusok:

AMV - *Alfalfa mosaic virus,* lucerna mozaik vírus
CaMV - *Cauliflower mosaic virus*, karfiol mozaik vírus
CCMV - *Cowpea chlorotic mottle virus*, tehénborsó klorotikus foltosság vírus
ClYVV - *Clover yellow vein virus*, here sárgaerűség vírus
CMV - *Cucumber mosaic virus*, uborka mozaik vírus
LMV - *Lettuce mosaic virus*, saláta mozaik vírus
PAMV - *Potato aucuba mosaic virus,* burgonya aucuba mozaik vírus
PLRV - *Potato leafroll virus,* burgonya levélsodródás vírus
PMTV - *Potato mop top virus,* burgonya szártörpülés vírus
PPV - *Plum pox virus*, szilva himlő vírus
PRSV - *Papaya ringspot virus*, papaya gyűrűsfoltosság vírus
PSbMV - *Pea seed-borne mosaic virus,* borsó maggal átvihető mozaik vírus
PSTVd - *Potato spindle tuber viroid,* burgonya orsósgumójúság viroid
PVA - *Potato virus A*, burgonya A vírus
PVM - *Potato virus M,* burgonya M vírus
PVS - *Potato virus S,* burgonya S vírus

PVT - *Potato virus T,* burgonya T vírus
PVU - *Potato virus U,* burgonya U vírus
PVV - *Potato virus V*, burgonya V vírus
PVX - *Potato virus* X, burgonya X vírus
PVY - *Potato virus Y*, burgonya Y vírus
SMV - *Soybean mosaic virus*, szója mozaik vírus
TEV - *Tobacco etch virus*, dohány karcolatos vírus
TMV - *Tobacco mosaic virus*, dohány mozaik vírus
ToMV - *Tomato mosaic virus,* paradicsom mozaik vírus
TRV - *Tobacco rattle virus,* dohány rattle vírus
TSWV - *Tomato spotted wilt virus,* paradicsom bronzfoltosság vírus
TuMV - *Turnip mosaic virus*, tarlórépa mozaik vírus
TVMV - *Tobacco vein mottling virus,* dohány érfoltosság vírus

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLOK

A burgonya az emberiség táplálásában alapélelmiszer, a negyedik legfontosabb termesztett növényünk. Jelentőségét alátámasztja, hogy az ENSZ 2008-at a Burgonya Nemzetközi Évévé nyilvánította azzal a céllal, hogy minél jobban tudatosítsa a burgonya kiemelten fontos szerepét a szegénység és az éhezés leküzdésében, és elősegítse a burgonyán alapuló táplálkozási rendszerek kutatását és fejlesztését.

Hazánkban a 19. század óta termesztett burgonya fontos és kedvelt élelmiszer, azonban az 1970-es évektől vírusos leromlása olyan méreteket öltött, hogy az államilag elismert fajták, mint például a *Gülbaba*, az *Aranyalma*, a *Kisvárdai Rózsa* vagy a *Mindenes* kiszorultak a köztermesztésből. A Hollandiából importált fajták vetőgumócserés rendszerével a hazai fajták nem tudtak versenyezni. Az ágazat ma is fennálló rossz helyzete csak a biológiai alapok javításával és bővítésével változtatható meg. A keszthelyi nemesítő munka eredményeképpen a nemzeti fajtalistán immár 11, nagyobb részben vírusellenálló új magyar burgonyafajta található, de a mezőgazdaság diverzitásának fokozása érdekében az is fontos, hogy az értékes tulajdonságokkal bíró, kedvelt régi fajtákat fenntartsuk.

A leromlásra hajlamosító tényezők Magyarországon elsősorban a PLRV (burgonya levélsodródás vírus), a PVX és PVY (burgonya X és Y vírus), egyéb kórokozók közül pedig a *Phytophtora* és az *Alternaria*. A 80-as években Magyarországon megjelent egy új, az addig meglévő rezisztenciát áttörni képes PVY törzs (PVY^{NTN}), amely súlyos károkat okoz járványok idején. Míg a gombákkal szembeni védekezés vegyszeresen részben megoldott, a vírusok ellen a legjobb megoldás a hatékony szántóföldi rezisztenciájú fajták előállítása. A vad *Solanum* fajokban megtalálható rezisztenciagének azonban gyakran kedvezőtlen tulajdonságokkal kapcsoltak, így ezek hagyományos nemesítéssel történő felhasználása csak hosszadalmas és munkaigényes szelekciós folyamat után válik lehetővé. A hagyományos nemesítéssel szemben egyszerűbb, gyorsabb, költségkímélőbb és teljes védettséget adó alternatíva a rezisztens fajták géntechnológiai módszerekkel történő előállítása.

Az elmúlt több mint két évtizedben kidolgozott transzformációs rendszerek lehetővé tették előnyös tulajdonságokat kiváltó szekvenciák célzott bejuttatását különböző növényfajokba. A víruseredetű géneket transzgénként felhasználó módszerek közül legelterjedtebb a köpenyfehérje gént tartalmazó konstrukciókkal történő transzformáció, melyet számos növény-vírus kombinációban használtak sikerrel. A kutatási eredmények alapján azonban a rezisztencia kiváltásához nincs szükség a fehérje jelenlétére, ezért a legújabb vírusrezisztens növények már nem-expresszálódó szekvenciákat tartalmaznak.

A genetikailag módosított (GM) növényekkel történő kutatásokat, szántóföldi vizsgálatokat, engedélyeztetésüket és köztermesztésbe kerülésüket szigorú törvények szabályozzák szerte a világon. Hosszú távon a kívánatos az, hogy a GM növények a lehető legkevesebb idegen szekvenciát tartalmazzák, amely magában foglalja a marker gének teljes hiányát is. Az Európai Unió ennek érdekében 2004-től betiltotta az antibiotikum markerek használatát. Noha a vírusrezisztens növények szelekciós markerek használatával történő előállítása gyakorlati szempontból jóval egyszerűbb, az ökológiai és egészségügyi kockázatokkal kapcsolatban napjainkban gyakran felmerülő társadalmi aggodalmak új módszerek kidolgozását és alkalmazását teszik szükségessé.

Célunk volt, hogy molekuláris biológiai és biotechnológiai eszközök segítségével a hazai flórából származó PVY-H izolátum segítségével a vírus különböző törzsei ellen hatékony védettséget alakítsunk ki egy környezeti és egészségügyi szempontból is biztonságos génkonstrukcióval, egy burgonyában eddig nem alkalmazott transzformációs módszer segítségével.

Ennek megvalósításához az első feladat olyan bináris vektor előállítása, amelybe a PVY-H genomi szekvencia részletét (CP és 3'NTR) fordított ismétlődés formájában építjük be, és amely nem tartalmaz antibiotikum rezisztencia markergént. A transzgén konstrukció növénybe juttatására shooter mutáns *Agrobacterium tumefaciens*-en alapuló transzformációs rendszert terveztünk használni, amelyet burgonyára adaptálunk. Kísérleteinket elsősorban magyar burgonyafajtákkal végezzük, megvizsgálva annak lehetőségét, hogy a rég elfeledett, egykor kiváló fajtákban kialakítható-e vírusrezisztencia az általunk készített konstrukcióval.

Továbbá célunk volt különböző PVY törzsekhez tartozó izolátumok és a PVY-N605 fertőzőképes cDNS klón felhasználásával intraspecifikus PVY kimérák készítése, és terveztük az így előállított kimérák fertőzőképességének és a kicserélt szekvenciák tünetkialakításban játszott szerepének vizsgálatát különböző gazdanövényfajokon.

Végül a két részfeladat összekapcsolásaként a munka első fázisában előállított néhány transzgénikus burgonyavonal rezisztencia vizsgálatát terveztük a víruskimérákkal és az előállításukhoz használt szülői PVY törzsekkel.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A burgonya jelentősége

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) a világon a negyedik legfontosabb tápláléknövény. Géncentrumai Mexikóban, Peruban és Chilében találhatók. Amerika bennszülött lakossága mintegy 6000 éve termeszt burgonyát az Andok magasabb fekvésű tájain, ahol az a kukorica helyett a hegyvidékeken az indiánok fő tápláléka volt. Európába a spanyolok hozták be az 1500-as években, ahol alkalmazkodott az éghajlathoz és fontos alapélelmiszerré vált, majd az egész világon elterjedt.

A burgonya termesztésére olyan területek is alkalmasak, ahol a művelhető földterület nagysága korlátozott, ám a munkaerő bőséges – ezek olyan feltételek, amelyek leginkább a fejlődő világot jellemzik. A burgonya rövidebb idő alatt, kisebb földterületen és szélsőségesebb klimatikus körülmények között több tápanyagot termel, mint a többi fontos termesztett tápláléknövény. Emberi fogyasztásra a növény 85 %-a alkalmas, míg a gabonaféléknél ez az arány csak 50 %. Az étrendhez szénhidrátokkal, vitaminokkal és ásványi anyagokkal járul hozzá. A gyökér- és gumós zöldségek közül a legmagasabb – mintegy 2 % – fehérjetartalommal bír, amely aminosav összetételét tekintve táplálkozási szempontból igen kedvező. Könnyen emészthető, valamint sok más zöldséggel ellentétben jól és sokáig eltartható.

Az élelmiszerbiztonság számára nagy kihívást jelentő kártevők, betegségek és abiotikus stressz elleni védekezés sikeréhez a genetikai források nyújtják a legbiztonságosabb és leggazdaságosabb hátteret. A diverzitás megőrzése ezért a burgonya esetében is rendkívül fontos. A Nemzetközi Burgonyaközpont (CIP) génbankja nyolc latin-amerikai országból származó 100 vad faj mintegy 1500 mintáját és 3800 tradicionális Andok-beli termesztett fajtát tart fenn. Formájuk és méretük változatos, színük a fehértől a vörösön át a liláig, illetve a feketéig terjed. Eddig a megóvásra szánt helyi fajták 80 %-át és a vad fajták 55 %-át biztonságba helyezték, ám sok fajta helyzete még kétséges.

A burgonya jelentőségét mi sem bizonyítja jobban, mint hogy az ENSZ 2008-at a Burgonya Nemzetközi Évévé nyilvánította. A határozat kimondja, hogy a burgonya a világ lakossága táplálásában alapélelmiszer. A Burgonya Nemzetközi Éve küldetése az, hogy a burgonya biológiai és tápértékbeli tulajdonságait hangsúlyozva ráirányítsa a figyelmet arra a szerepre, amelyet ez a növény az élelmiszerbiztonságban és a szegénység visszaszorításában játszik, ezzel is támogatva a burgonya termelését, feldolgozását, fogyasztását, marketingjét és

kereskedelmét, valamint hogy elősegítse a burgonyán alapuló táplálkozási rendszerek kutatását és fejlesztését.

Az elmúlt 10 év során a burgonyatermelés évente átlagosan 4,5 %-kal, míg a beültetett terület nagysága 2,4 %-kal nőtt. Bár az 1960-as évek elejétől kezdődően az európai burgonyatermelés csökken, ezt bőven ellensúlyozza az Ázsiában, Afrikában és Latin-Amerikában tapasztalt fejlődés, ami a megtermelt mennyiség globális növekedését eredményezi és megerősíti a burgonya egyre nagyobb jelentőségét, mint a fejlődő országok élelmiszer-, foglalkoztatási- és bevételi forrása.

Magyarországon a burgonyatermesztés a 19. század második felében terjedt el. A saját fajták nemesítése a Nyírségben kezdődött, mely ma is a vetőgumó termesztés egyik centruma. Teichmann Vilmos nevéhez fűződik a Gülbaba (1929), Kisvárdai rózsa (1955) és a Mindenes (1960) fajták előállítása. A somogyi termesztési körzetben Barsy Sarolta nemesítő munkájának eredménye a Somogyi sárga, a Somogyi korai (1959) és a Somogyi kifli (1960) fajta. Az 1960-as évek végén az ország vetőgumó termesztése jórészt ezeken a fajtákon alapult. A 70-es évek elejére a vírusok okozta leromlás eredményeként az elit szaporítóanyag nagy része nem felelt meg a szabvány előírásainak, ezért jelentős mennyiségű import vetőgumó került az országba. A magyar fajták részaránya rohamosan csökkenni kezdett, helyüket átvették a holland importból származó fajták, amelyek szintén nem ellenállók a vírusokkal szemben, de vetőanyaguk minden évben beszerezhető. A hazai burgonyatermesztés hosszú időre importfüggőségbe került, és a behozott szaporítóanyaggal egy sor új kártevő illetve kórokozó is megjelent. A régi magyar fajták fokozatosan kiszorultak a termesztésből, a fajtalistáról is lekerültek.

A Pannon Egyetem Agrártudományi Centrumának keszthelyi Burgonyakutatási Központjában már több évtizede foglalkoznak rezisztencia-nemesítéssel. A hazai klimatikus viszonyok között hamar leromló holland fajtákkal szemben a keszthelyi burgonyafajták jól alkalmazkodnak a szélsőséges termőhelyi viszonyokhoz, stressztűrőek, stabil termőképességűek, és ellenállóak a vírusbetegségekkel szemben. A külföldi fajtáknál alacsonyabb önköltséggel, gazdaságosabban termeszthetők, a vetőgumók visszaültethetők. A 11 bejegyzett keszthelyi burgonyafajta széles választékot kínál a termelők számára mind tenyészidőben, mind felhasználhatóságban. Ezen új fajták termesztése az ország burgonya vetésterületének mintegy 18 %-án folyik. A tendencia remélhetőleg folytatódni fog, mivel az EU-n belüli ellenőrizetlen árumozgás és a bővülő import kockázatai ezáltal jelentősen csökkenthetők.

2.2. A burgonya betegségei

A burgonya sikeres termesztését számos biotikus és abiotikus tényező nehezíti. A szántóföldi élelmiszernövények közül talán a legtöbb kórokozója és kártevője a burgonyának van. Legveszélyesebb betegsége az akár járványszerűen is fellépő burgonyavész, amelynek gombakórokozója a *Phytophtora infestans*. A járványok kialakulásában fontos szerep jut az esőnek és a szélnek (a légáramlatokkal 50–60 km-re eljuthatnak a sporangiumok), helytelen tároláskor pedig a nagy páratartalom és a kondenzvíz növeli a kockázatot. Ez a betegség volt az oka a világszerte ismert éhínségnek, amely 150 évvel ezelőtt hatalmas pusztítást végzett Írországban és Európa más részein.

A burgonya számos gombakórokozója közül fontosak még a *Fusarium* fajok (fuzáriumos gumórothadás), *Alternaria alternata, A. solani* (alternáriás levélfoltosság és gumókorhadás), *Synchytrium endobioticum* (burgonyarák), *Rhizoctonia solani* (burgonyahimlő), *Helminthosporium solani* (burgonygumó-ezüstfoltosság), *Verticillium albo-atrum* (verticilliumos fertőző hervadás), *Colletotrichum coccoides* (kolletotrihumos száradás és tőkorhadás), *Phoma foveata* (fómás gumókorhadás), *Spongospora subterranea* (spongospórás (poros) varasodás) és *Macrophomina phaseolina* (makrofominás hervadás).

A baktérium kórokozók közül az *Erwinia* fajok (fekete szártőrothadás), és a *Streptomyces* fajok (varasodás) a leggyakoribbak. Nagyon súlyos károkat okoz a *Ralstonia solanacearum* (baktériumos barnarothadás) és a *Clavibacter michiganensis* (a burgonyagumó gyűrűsrothadása).

A sztolbur fitoplazma (*Stolbur phytoplasma*) az egysejtűekhez (Protophyta) tartozó pleomorf kórokozó. A betegséget a meleg, száraz időjárási körülmények között megjelenő kabócák terjesztik. A beteg növény törpül, levele kanalasodik, elszíneződik. A gumó kicsi, gumiszerű tapintású és ún. cérnahajtásképződés figyelhető meg.

A burgonya legveszélyesebb lombkártevője a burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*), mely az egész világon évről évre rendszeresen előfordul. Észak-Amerikából került Európába, hazánkban 1947-ben találták meg az első példányokat. Az imágó és a lárva is károsít. A védekezés kötelező ellene, amit minden burgonyatermesztő saját érdekében is megtesz, hiszen enélkül akár 70 %-os termésveszteség is előfordulhat. Mind a lárva, mind a bogár május-augusztus hónapokban a zöld növényi részeket károsítja. A lárvák táplálékigénye nagy, különösen az L3 és L4 fenológiai állapotban. A levéllemez után a maradék ereket, szárakat is megrágják. Ha sok lárva van egy-egy burgonyatövön, kártételük után csak a vastagabb szárak maradnak meg.

Egyéb burgonyakártevők többek között a *Globodera*, *Ditylenchus*, *Meloidogyne* nemzetségbe tartozó fonálféreg fajok, cserebogárpajorok (*Melolontha* sp.), *Agriotes*-fajok, stb.

Szót kell ejteni a burgonya élettani károsodásairól is, melyek sok esetben nagy gazdasági jelentőségűek. Ilyenek a gumófejlődési rendellenességek, gumótorzulás**,** átnövés és füzéresedés, feketeszívűség, vasfoltosság, cérnacsíra- és csíragumóképzés, zöldülés, fehérszemölcsösség, szürkefoltosság. Előfordulásuk alapvető oka valamilyen, az optimálistól eltérő termesztési, vagy tárolási körülmény, de a tünetek súlyosságára, az előfordulás gyakoriságára jelentős hatással van a genotípus is. (Rod és mtsi, 2005; Cziklin és mtsi, 2005; http://www.agraroldal.hu/burgonya-vedelme_cikk.html)

Vírusos betegségek

Vírusokból és vírusszerű szervezetekből több mint 40-féle kórokozó fertőzi a burgonyát, amelyek a közvetlen kártétel mellett a vetőgumó termőképességét, biológiai értékét is veszélyeztetik.

A burgonya gazdaságilag talán legfontosabb vírusa a burgonya levélsodródás vírus (PLRV). A PLRV mindenütt előfordul, ahol burgonyát termesztenek és a már említett burgonyavész után a legsúlyosabb károkat okozza. A beteg növény a fejlődésben visszamarad, levelei kanalasodnak, sodródnak, klorotikusak, törékenyek, üveges tapintásúak, és gyakran vöröses elszíneződésűek. A kórokozó vegetatív úton és perzisztens (cirkulatív) módon levéltetvekkel terjed, mechanikai úton nem vihető át.

A PLRV mellett a másik legfontosabb vírusként a burgonya Y vírust (PVY) tartják számon. A vírusfertőzés 10-100 %-os termésveszteséggel járhat az izolátum virulenciája, a termesztett fajta toleranciája, a fertőzés időpontja és időtartama, valamint környezeti tényezők függvényében (De Bokx és Huttinga, 1981). A PVY az egész világon elterjedt; a mediterrán országokban és Afrikában az első számú, Dél-Amerikában és Európa többi részén a második legfontosabb növényi vírus, de Észak-Amerikában is nagy jelentőségű (Shukla és mtsi, 1994). A PVY a PVX-szel és PLRV-vel kevert fertőzésben okozza a burgonya ún. vírusos leromlását, amely így nagy terméskiesést eredményezhet (Hollings és Brunt, 1981, Horváth, 1995).

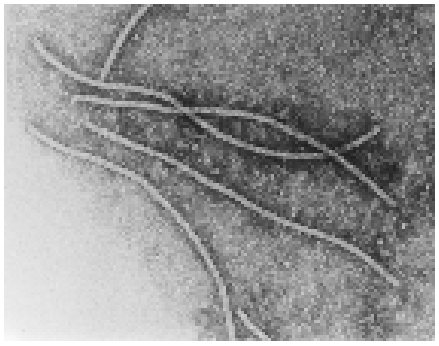
A burgonya A és a burgonya X vírus (PVA, PVX) is világszerte elterjedt. A legtöbb törzs tünetmentes vagy enyhe mozaikfoltosságot okoz a leveleken, de gyakran kevert fertőzésekben (pl. PVY-PVX) fordulnak elő, ami a tüneteket nagymértékben súlyosbítja.

A paradicsom bronzfoltosság vírus (TSWV) hazánkban burgonyán ritkán károsít, de az Egyesült Államokban a burgonya egyik fontos vírusa. A fertőzött növények a fejlődésben visszamaradnak, törpülnek. A leveleken jellegzetes sárga mozaik (kalikó) tüneteket okozó

lucerna mozaik vírussal (AMV) elsősorban a burgonya lucernatábla mellé való ültetésekor kell számolni. Inkább csak lokális jelentőségűek a burgonya S, M, T, U, V vírus (PVS, PVM, PVT, PVU, PVV), a dohány rattle vírus (TRV), a burgonya szártörpülés vírus (PMTV), a burgonya aucuba mozaik vírus (PAMV), a dohány mozaik vírus (TMV) és a paradicsom mozaik vírus (ToMV). A legjelentősebb viroid kórokozó a burgonya orsósgumójúság viroid (PSTVd).

2.3. A PVY rendszertani besorolása és jellemzése

A PVY a pozitív (szensz) egyszálú RNS (+ ssRNS) vírusok közé tartozik, ezen belül a *Potyviridae* család és a *Potyviru*s nemzetség névadó típustagja. A vírust Smith (1931) írta le Nagy-Britanniában, majd Harrison és mtsi (1971) sorolták a PVY-t és a hozzá hasonló vírusokat egy csoportba, amelyet később a potato Y virus név alapján (*poty*-) neveztek el. A *Potyviridae* a legnépesebb és gazdaságilag a legjelentősebb víruscsalád. Az összes növényi vírus 30%-a, több mint 200 faj tartozik ide (Ward és Shukla, 1991). A *Potyvirus* nemzetség tagjai hajlékony, fonal alakú, burok nélküli, 11-15 nm átmérőjű, 680-900 nm hosszúságú növényi vírusok (2.1 ábra). A virion megközelítőleg 5 % nukleinsavat és 95 % fehérjét tartalmaz (Dougherty és Carrington, 1988). A vírus RNS-t mintegy 2000 köpenyfehérje alegység (coat protein – CP) burkolja (Martin és Gelie, 1997).



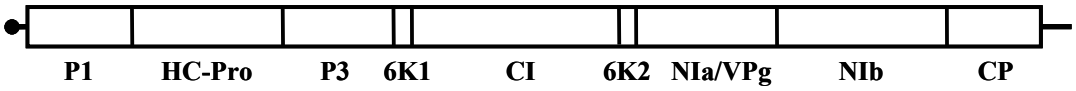
2.1 ábra. PVY virionok elektronmikroszkópos képe. Forrás: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/)

A PVY jelenlegi ismereteink szerint 31 család 72 nemzetségébe tartozó 405 növényfajt fertőz (Edwardson és Christie, 1997), de legfőképpen a *Solanaceae* családba tartozó növényeket károsítja. Gazdasági szempontból a burgonya, dohány, paradicsom, paprika, padlizsán kultúrákban jelentős.

A PVY vektorai levéltetvek, a vírus átvitelére mintegy 20 különböző nemzetségbe tartozó faj képes. Az átvitel módja nem perzisztens típusú, azaz a vírus terjedése gyors, de a vektor csak néhány óráig fertőzőképes. Egyetlen fertőzőképes levéltetű több növényt is képes megfertőzni. A vírusterjedés gyorsasága függ a levéltetű-populáció nagyságától és a fertőzött növények mennyiségétől. Az egészséges növények más növényfajokról, vagy gyakran a fertőzött burgonyagumókból kihajtó növényekről fertőződnek. Fertőzött gumó fennmaradhat a talajban átvészelve a telet, de az is előfordulhat, hogy betakarítás után nem vehető észre a fertőzöttség és a gumókat a következő évben felhasználják vetőburgonyaként. Az ilyen módon létrejött másodlagos fertőzés súlyosabb következményekkel jár, mint az elsődleges.

2.3.1. A genom felépítése és a géntermékek funkciói

A PVY genomja egyfonalas, pozitív orientációjú RNS, amely izolátumtól függően 9538-9706 nukleotidból áll. A szensz vírusgenom messenger RNS-ként viselkedik, az 5’ nem kódoló régióval, mint transzlációs enhanszerrel. A genomi RNS egy hosszú nyitott leolvasási keretet (ORF) tartalmaz, melyről egy nagy, 340-368 kDa-os poliprotein prekurzor keletkezik. Ezt a vírus által kódolt proteázok (P1, HC-Pro és NIa) hasítják a P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, NIa/VPg, NIb, CP fehérjékre.



2.2 ábra. A Potyvírusok genomszerveződése és géntermékei.

A potyvírus poliprotein prekurzor hasítási termékei és azok funkciói (az N-terminális végtől a C-terminális vég felé) (2.2 ábra):

A P1 fehérje proteináz funkcióval bír, a poliprotein érésekor arról önmagát hasítja le. Önmagában nem nélkülözhetetlen a vírus fertőzőképességéhez, ám a P1-HC-Pro közötti hasítás kulcsfontosságú ebből a szempontból (Verchot és Carrington 1995). Ezen kívül a P1-nek szerepe lehet a vírus mozgásában is (Arbatova és mtsi, 1998). Míg a C terminálisán a katalitikus doménnek megfelelő konzervált aminosavak találhatóak, az N terminális rész hipervariábilis (Vance és mtsi, 1992).

A HC-Pro (helper komponens proteináz) multifunkcionális fehérje. Cisztein-típusú proteinázként részt vesz a poliprotein prekurzor hasításában, és PTGS szuppresszor

aktivitással bír. Alapvető szerepe van a vírus sejtről sejtre történő és hosszú távú mozgásában, a genom amplifikációjában és a vírus levéltetvek általi terjedésében (Maia és mtsi, 1996; Flasinski és Cassidy, 1998; Varrelmann és mtsi, 2007).

A P3 fehérje az egyik legvariábilisabb potyvírus protein (Shukla és mtsi, 1991). Sejtbeli lokalizációjának vizsgálata alapján arra következtettek, hogy a vírus amplifikációban van szerepe, mivel minden esetben az RNS replikációhoz szükséges fehérjékhez (CI, NIb, VPg) illetve membránokhoz kapcsolódott (Langenberg és Zhang, 1997), bár RNS kötő képessége nincsen (Merits és mtsi, 1998). Újabb vizsgálatok szerint a TuMV P3 avirulencia determinánsként is funkcionál, vagyis a gazda rezisztencia mechanizmusa felismeri (Jenner és mtsi, 2003).

A CI (cylindrical inclusion) protein vagy citoplazmikus zárványfehérje szélkerék alakú testeket formál a citoplazmában, amelyet a *Potyvirus* genus egyik bélyegének tekintenek. Laín és munkatársai (1990) igazolták a fehérje RNS helikáz természetét. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint a CI gyakran a plazmodezmák közelében található (Roberts és mtsi, 1998), ami arra utal, hogy szerepet játszik a transzportban, azonban nem jut át a szomszédos sejtbe, csak segíti a nukleoprotein komplex eljutását a plazmodezmákhoz.

A 6K1 és 6K2 proteinek kis, 6 kDa-os fehérjék, amelyek nélkülözhetetlenek a vírus replikációhoz. Hong és mtsi (2007) az SMV 6K1-et a sejt perifériáján detektálták, ami mozgási fehérje funkcióra utal, bár hiányzik belőle az ilyen fehérjékre jellemző transzmembrán domén. A TEV 6K2 proteinről Restrepo-Hartwig és Carrington (1994) bizonyították, hogy az endoplazmatikus retikulum membránhoz kötött. Schaad és mtsi (1997a) hipotézise szerint a 6K2 a replikáció során a CI-t és VPg-t a membránhoz horgonyozza. Ezen kívül a 6K2 protein szerepét a vírus hosszú távú mozgásában és a gazdaspecifikus tünetek kialakításában is feltételezik (Spetz és Valkonen, 2004).

A vírusgenomhoz kovalensen kötött VPg protein védi az mRNS-t az exonukleázok hasításától, és feltehetően primerként működik az RNS replikáció során. Gazdafaktorokkal kapcsolatba lépve részt vesz a hosszú távú mozgásban. (Schaad és mtsi, 1997b). A protein középső részében történt aminosavcserék hatására bizonyos PVY izolátumok áttörték a rezisztenciát (Masuta és mtsi, 1999), ami a gazda-patogén kapcsolatokban betöltött virulencia determináns szerepére utal. A VPg virulencia determináns szerepét alátámasztja, hogy a virionhoz kapcsolva gazdafehérjék által foszforilálódik (Puustinen és mtsi, 2002).

A potyvírusok sejtmagi zárványtestecskéit (nuclear inclusion (NI) bodies) két fehérje, az NIa és NIb építi fel, amelyek nukleáris transzport szignálokat tartalmaznak (Restrepo és mtsi, 1990). Az NIa a teljes nukleáris zárványfehérje több mint 95 %-át teszi ki. E kétfunkciós poliprotein N-terminális doménje a fentebb jellemzett VPg, amely egy belső hasítási helyen

gyakran (de nem mindig) lehasad a poliproteinről, míg C-terminálisan a proteináz régió található (Dougherty és Parks, 1991). Az NIb a nagyobb sejtmagi zárványfehérje és egyben a potyvírusok legkonzerváltabb proteinje. A citoplazmában betöltött funkciója szerint RNS-függő RNS polimeráz (Klein és mtsi, 1994), sejtmagbeli szerepe azonban máig nem világos.

A köpenyfehérje (CP - coat protein) a legrészletesebben jellemzett fehérje, amelyet a genetikai diverzitás és a taxonómiai viszonyok feltárása céljából is leggyakrabban vizsgálnak. Ennek szerológiai tulajdonságai alapján sorolták be a *Potyviridae* család tagjait genusokba, fajokba, illetve törzsekbe (Shukla és mtsi, 1994). A genomot körülbelül 2000 köpenyfehérje molekula csomagolja be. A CP C- és N-terminális vége variábilis, utóbbi vírusspecifikus epitópokat tartalmaz. A középső, konzerváltabb domén a CP molekulák struktúrájának kialakításában és azok összekapcsolásában játszik szerepet. A vektorokkal való terjedéshez az N-terminálison található konzervált DAG aminosav motívum jelenléte nélkülözhetetlen (Atreya és mtsi, 1990). A HC-Pro-ban azonosított vírusátvitelért felelős motívum (PTK) feltehetően hidat képez a CP DAG motívumával (Huet és mtsi, 1994). López-Moya és Pirone (1998) megfigyelték, hogy a DAG motívum első aminosavának megváltoztatása a szisztemikus fertőzés hiányát és limitált sejtről-sejtre történő mozgást eredményezett.

Az adeninben gazdag 5’ nem kódoló régió (5’NTR) feltehetően transzlációs enhanszerként működik (Carrington és Freed, 1990). Riechmann és mtsi (1992) néhány potyvírus (PPV, PVY, TVMV, TEV) 5’NTR-jében a replikáció és transzláció szempontjából fontos konzervált régiókat azonosítottak, míg Simon-Buela és mtsi (1997) azt találták, hogy a PPV 5’NTR nem szükséges a fertőzőképességhez, de hozzájárul a vírus versenyképességéhez és patogenitásához.

A 3’ nem kódoló régió (3’NTR) hossza variábilis. A rokon törzsek között hasonló, de a fajok között nincs magas fokú homológiája, ami alapján jól használható a potyvírusok klasszifikációjában, a genetikai távolságok megállapításában. Rodriguez-Cerezo és mtsi (1991) megállapították, hogy a TVMV mutáns 3’NTR-jében jelenlévő inszerció közvetlenül hat a tünetek alakulására. Tacahashi és Uyeda (1999) a genom 3’ végén található poliadenilált szekvencia hatását ClYVV-nál vizsgálva azt találták, hogy legalább 5-10 adenozin jelenléte szükséges a fertőzőképesség magas szinten való fenntartásához.

2.3.2. A tünetkialakításban szerepet játszó genomi régiók

A vírustünetek kialakulása komplex folyamat, amelyben számos növényi és virális gén vesz részt. A folyamat részletei még a víruspartner oldaláról sem mind ismertek, de az eddigi eredmények alapján a potyvírusok tünetkialakítását a vírusgenom több régiója befolyásolja: a

HC-Pro, P1, P3, 6K1, CI és CP. A HC-Pro fehérje szerepét a tünetek kialakításában több potyvírus esetén is igazolták. Tribodet és mtsi (2005) a *N. tabacum* cv. Xanthi érnekrózisáért felelős determinánsokat keresve két aminosavat azonosítottak a PVY-N605 HC-Pro C-terminális régiójában a proteináz aktív hely közelében. Yambao és mtsi (2008) szintén két mutáns, a HC-Pro egyik RNS-kötő doménjében elhelyezkedő aminosavat tett felelőssé a ClYVV babon okozott nekróziásért. A nekrotikus tünetek valószínűleg a HC-Pro silencing szuppresszor aktivitásával hozhatók összefüggésbe, és a vírus okozta fejlődési zavarok is köthetőek az RNAi útvonal megzavarásához. Kasschau és mtsi (2003) kimutatták, hogy a TuMV P1/HC-Pro silencing szupresszor interferál a konzervált miRNS-ek szabályozta géncsendesítési útvonallal, és a fejlődési zavar jellegű tünetek ennek a következményei lehetnek. A HC-Pro mellett a P3 protein illetve egy esetben a 6K1 szerepét is igazolták más potyvírus-gazda kapcsolatokban (Saenz és msti, 2000; Jenner és mtsi, 2003), valamint a HC-Pro és a CP koordinált együttműködése is bizonyított (Andrejeva és mtsi, 1999; Paalme és mtsi, 2004). Feki és mtsi (2005) kimutatták, hogy dohányban a PVY CP interakcióba lép a RubisCO enzim nagy alegységével. Ez együtt jár a fotoszintézis zavarával és a kloroplasztiszok abnormalitásával, ami a mozaikos és sárgulásos vírustünetekkel korrelál. Bár a tünetdeterminánsok általában fehérje formában fejtik ki hatásukat, az LMV okozta saláta szisztemikus hervadással a P1 és CI régiónak megfelelő RNS-t hozták összefüggésbe (Krause-Sakate és mtsi, 2005). Rodriguez-Cerezo és mtsi (1991) a 3'NTR-ben inszerciót hordozó mutáns TVMV-t vizsgálva a tünetek enyhülését tapasztalták, miközben a vírus fertőzőképessége nem változott.

2.3.3. Törzsek, izolátumok

A klasszikus felosztás szerint burgonyán, dohányon és *Physalis floridana*-n okozott szisztemikus és lokális tünetek alapján a PVY-nak három törzsét különböztették meg: PVY^O (ordinary), PVY^N (necrotic) és PVY^C (C törzs). A PVY^O-hoz sorolták azokat az izolátumokat, amelyek a burgonya levelein erőteljes rácosodást, gyűrődést vagy „leaf-drop streak"-et, *P. floridana*-n nekrózist, dohányon pedig foltosodást okoztak. A PVY^N törzsbe sorolt izolátumok burgonyán és *P. floridana*-n nagyon enyhe foltosodást, dohányon pedig súlyos érnekrózist okoztak. A PVY^C típusba azokat az izolátumokat sorolták, amelyek az *Nc* domináns rezisztenciagént tartalmazó burgonyafajtákon hiperszenzitív reakciót (HR), a fogékony burgonyafajtákban mozaikot vagy „stipple streak"-et, *P. floridana*-n nekrózist, dohányon pedig foltosodást idéztek elő (Shukla és mtsi, 1994). A PVY^C törzs különlegessége, hogy a köpenyfehérje gén defektusa révén nem vihető át levéltetű vektorral.

Az 1980-as évek elején megjelent, majd az egész világon elterjedt (Nie és Singh, 2002) egy új, a burgonyagumón és -bogyón nekrotikus gyűrűket kialakító és a rezisztenciát áttörni képes törzs, amelyet először Magyarországon írtak le Beczner és mtsi (1984).

Az új izolátum jellegzetes gumótünetei (2.3 ábra) alapján a betegséget burgonya gumó nekrotikus gyűrűsfoltosságnak nevezték el, és a vírust új törzsbe sorolták, amely a tünetek alapján kapta a PVY^{NTN} (necrotic tuber necrosis) nevet. Az utóbbi két évtizedben a nekrotikus gyűrűsfoltosságot okozó törzsek a burgonya legfontosabb víruskórokozójává váltak.

2.3 ábra. Nekrotikus gyűrűsfoltosság tünetei burgonyagumón. *Forrás: http://www.affa.gov.au/*

A máig összegyűjtött rendkívül nagyszámú PVY izolátum osztályozása, besorolása valóságos kihívást jelent e vírus sokfélesége következtében. A molekuláris technikák fejlődésével lehetővé vált a teljes vírusgenomok nukleinsav sorrendjének meghatározása és analízise, amellyel egyre pontosabb képet kaphatunk az egyes izolátumok rokonságáról, a köztük lezajlott rekombinációkról. A jelenleg fellelhető teljes genomi szekvenciák összehasonlítását és az izolátumok filogenetikai rokonságát több szerző vizsgálta (Lorenzen és mtsi, 2006; Schubert és mtsi, 2007), emellett az új izolátumok leírása is folyamatosan zajlik. Legutóbb Lorenzen és mtsi (2008) számoltak be egy, az eddig ismertektől különböző genetikai felépítésű izolátumról (NE-11), amelynek genomja sajátos keverékét mutatja a PVY^{N} és az ún. észak-amerikai típusú, gumó nekrózist indukáló törzsnek (PVY^{NA-NTN}), de ezen kívül a köpenyfehérje régióban egy teljesen új típusú szekvenciarészletet is tartalmaz. Ogawa és mtsi (2008) Japán különböző részeiből származó izolátumokat vizsgáltak és hasonlítottak össze európai és észak-amerikai PVY szekvenciákkal. Mindegyik japán izolátumot a nem-rekombináns, nekrotikus gyűrűsfoltosságot indukáló PVY^{NA-NTN} típusba soroltak. Ezen kívül elsőként számoltak be két azonos származási vonalhoz (lineage) (észak-amerikai és európai PVY^{N}) tartozó vírus közötti rekombinációról.

A PVY nevezéktanában és besorolása körül kialakult meglehetősen kaotikus helyzet rendezésére tettek javaslatot Singh és msti (2008). Kiemelték, hogy egy-egy izolátum valamely törzsbe való besorolásához alapvető fontosságú bizonyos, ismert rezisztenciagénekkel rendelkező burgonyafajtákon és dohányon való tesztelés. Az izolátum szekvenciája - bár lényeges információkat szolgáltat - önmagában nem elegendő adat, amíg nem ismerjük az egyes tünetekért felelős genetikai determinánsokat. A javasolt törzsneveket és az egyes törzsek definícióit a 2.1 táblázat tartalmazza.

2.1 táblázat. A PVY izolátumok jelenlegi klasszifikációs rendszere és az adott törzsekbe sorolás kritériumai (Singh és mtsi nyomán, 2008).

Törzscsoport	**Javasolt törzs név**	**Definíció**
PVY^{O}	PVY^{O}	'O' törzscsoport, HR-t indukál az *Ny* gént dominánsan hordozó burgonyafajtákban
PVY^{N}	PVY^{N}	Dohány érnekrózist okozó törzscsoport, az izolátumok nem okoznak PTNRD-t
PVY^{N}	PVY^{NTN}	PVY^{N} izolátumok, PTNRD-t okoznak
PVY^{N}	PVY^{N-Wi}	Rekombináns izolátumok, fenotípusosan PVY^{N}, de szerológiailag PVY^{O}
PVY^{C}	PVY^{C}	'C' törzscsoport, HR-t indukál az *Nc* gént dominánsan hordozó burgonyafajtákban
PVY^{Z}	PVY^{Z}	'Z' törzscsoport, HR-t indukál az *Nz* gént dominánsan hordozó burgonyafajtákban
PVY^{E}	PVY^{E}	'E' törzscsoport, nem indukál HR-t az *Ny*, *Nc* és *Nz* géneket dominánsan hordozó fajtákban és nem okoz nekrózist dohányon

2.4. Vírusok elleni rezisztencia kialakítása

A rezisztenciának több típusát különböztetjük meg, amelyek a természetes és a transzgén közvetítette rezisztenciára is alkalmazhatók. Extrém rezisztencia (ER) esetén a vírusreplikáció a fertőzés korai stádiumában gátolt, és nem jár együtt sejthalállal. Hiperszenzitív rezisztencia (HR) esetén kisszámú sejt pusztulásával (nekrózis) járó gyors védekezési reakció indul be, ami megakadályozza a fertőzés továbbterjedését. A toleranciát bár gyakran a rezisztencia szinonimájaként alkalmazzák, valójában mást takar. Az ilyen növényből kimutatható a vírus, mégsem jelennek meg rajta tünetek vagy azok sokkal gyengébbek (Solomon-Blackburn és Barker, 2001b). A rezisztencia alapulhat a vírus mozgásának különböző pontokon történő gátlásán is.

A termesztett növényekben fellelhető természetes rezisztencia gének mindegyike vad fajokból származik. Az ezekről a génekről felhalmozott hatalmas ismeretanyagból csak a burgonya vírusrezisztencia génjeire térünk ki röviden, hiszen a molekuláris biológia kora előtt ezek jelentették az egyetlen lehetőséget rezisztens fajták előállítására.

Solomon-Blackburn és Barker (2001a) a burgonya természetes vírusrezisztencia génjeiről megjelent áttekintő munkájában felsorolja a PVX, PVY, PVA és PVV ellen addig ismert körülbelül 30 rezisztencia gént. Közülük nyolcat már térképeztek, ebből öt PVX (*Rx, Rx1, Rx2,* Nb_{tbr}*,* Nx_{phu}), kettő PVY (Ry_{sto}*,* Ry_{adg}), egy pedig PVA (Ra_{adg}) ellen biztosít extrém vagy hiperszenzitív típusú rezisztenciát. A természetes PLRV rezisztencia nem ER vagy HR jellegű. A vírus kimutatható, de szaporodása csökkent mértékű. A leginkább rezisztens klónokban a fogékony növények víruskoncentrációjának 1-5 %-át detektálták, valamint megfigyelték, hogy a vektorátvitel is kisebb gyakorisággal történik,, ami igen hasznos a szabadföldi kultúrákban. Ezért a rezisztenciáért egy nemrég az 5-ös kromoszómára, más rezisztenciagének közelébe térképezett duplex gén (Rl_{adg}) felel (Velásquez és mtsi, 2007). TRV elleni ER létezik néhány fajtában, míg mások csak toleranciával rendelkeznek. A toleráns fajták termesztése nem ideális, mert vírusmentes területek fertőződése bekövetkezhet ezekből az állományokból. A burgonyanemesítés során felhasznált vad fajok, mint vírusrezisztencia források a *Solanum brevidens, S. spegazzini, S. stoloniferum, S. demissum, S. chacoense, S. tuberosum ssp. andigena, S. tuerosum ssp. tuberosum, S. microdontum, S. hougasii, S. acaule, S. sparsipilum, S. phureja* és *S. sucrense*.

2.4.1. Molekuláris módszerekkel kiváltott ellenállóképesség

A hagyományos nemesítés problémája, hogy a növényi rezisztencia géneket nem képes célzottan bejuttatni a fajtajelöltbe. A keresztezések során gyakran számos nemkívánatos tulajdonság is átkerül, amit csak hosszadalmas szelekciós procedúrával lehet kiküszöbölni. Erre a problémára megoldást jelent a molekuláris módszerek alkalmazása, mely módszerekkel kétféle módon lehet vírusrezisztenciát kialakítani. A legideálisabb megoldás egy növényi rezisztencia gén célzott bejuttatása, amihez a gén izolálására, majd a növény transzformációjára van szükség. A génizolálás azonban igen költség- és időigényes folyamat. Ennél sokkal egyszerűbb a vírusgenom egy részének beépítése az adott növénybe, ami szintén képes rezisztenciát kiváltani. A növényi transzformációs rendszerek és vektorok alkalmazásával ez már számos növényfaj esetében lehetővé vált. A növényi vírusok elleni mesterséges rezisztencia fehérje vagy RNS által közvetített lehet.

2.4.1.1. Fehérje által közvetített rezisztencia

Az első transzgénikus vírusellenálló növények létrehozásához a vírus köpenyfehérje génjét építették be, mivel a klasszikus keresztvédettségi reakció vizsgálatai alapján a védelemben a főszerepet a köpenyfehérjének tulajdonították. A klasszikus keresztvédettség jelenségét először McKinney (1929) írta le, aki TMV gyengített törzsével történő fertőzés esetén azt tapasztalta, hogy a későbbi vírustámadásnál a növény a vírus más izolátumaival szemben is rezisztens volt.

Az első ilyen kísérletben Powell-Abel és mtsi (1986) CaMV 35S promóterrel és poly(A) régióval ellátott TMV CP gént építettek be dohányba és paradicsomba. A transzgénikus növényekből származó fehérjekivonat 0.1 %-ban tartalmazta a vírus köpenyfehérjét. TMV-vel történő mesterséges fertőzés során a CP-t szintetizáló növényeken késéssel jelentkeztek a tünetek, illetve egy részük tünetmentes is maradt. A rezisztenciát a hasadó utódpopulációkon is ki tudták mutatni. Burgonyában az első kísérletek egyikeként PVX ellen alakítottak ki rezisztenciát szintén köpenyfehérje segítségével (Hemenway és mtsi, 1988). 1986 óta számos esetben hoztak létre CP által kiváltott védettséget a világ laboratóriumaiban mintegy 16 vírusnemzetség különböző tagjaival szemben, több gazdaságilag fontos növényfaj esetében (Józsa és Balázs, 2000).

A rezisztencia szintje azonban meglehetősen változó. Az extrém rezisztencia vagy teljes immunitás (Lawson és mtsi, 1990; Okamoto és mtsi, 1996) mellett előfordult, hogy a tünetek kifejlődése csak késett, vagy azok enyhébb formában jelentek meg (Stark és Beachy, 1989). Megfigyelték a kigyógyulási reakciót („recovery”) is, amikor elsődleges fertőződés után a később megjelenő fiatal levelek már tünet- és vírusmentesek (Palkovics és mtsi 1995). A rezisztenciát legtöbbször nem befolyásolja a vírus átviteli mód, de Lawson és mtsi (1990) azt tapasztalták, hogy a növények mechanikus inokuláláskor nem, ám levéltetűvel való átvitelkor megfertőződtek. Számos esetben specifikusan csak a transzgént adó vírustörzs ellen volt hatékony a rezisztencia, de olyan példák is vannak, ahol ez azonos genuson belül széles spektrumú (Hassairi és mtsi, 1998).

A köpenyfehérje gén mellett a replikázkomplex komponenseinek génjeit is sikeresen használták rezisztencia kiváltására. A polimeráz közvetítette rezisztencia jellemzően a vírusreplikáció erős gátlásával jár, és magas inokulumkoncentráció esetén is hatékony (Braun és Hemenway, 1992).

A vírusok mozgási fehérjéit (MP) is használták rezisztencia forrásként. Tacke és mtsi (1996) egyszerre használtak mutáns és vad típusú PLRV MP gént, és mindkettővel sikerült védettséget elérni - a mutáns génnel a PLRV mellett PVY és PVX ellen is.

2.4.1.2. RNS-ek által közvetített rezisztencia

Poszttranszkripcionális géncsendesítés (PTGS)

A köpenyfehérje vagy más vírusfehérjék által kialakítani kívánt rezisztencia kísérletek során számos esetben tapasztalták azt a jelenséget, hogy a rezisztencia a fehérje jelenlétének hiányában is kialakul (Kollár és mtsi, 1993; Smith és mtsi, 1995; Mueller és mtsi, 1995). Ez alapján arra következtettek, hogy ilyenkor a védettséget a transzgénről átíródó RNS váltja ki.
Az RNS silencing egy szekvenciaspecifikus géninaktivációs rendszer, amelynek természetes szerepe sokrétű: a genom védelme, a heterokromatin kialakulásának szabályozása, a génexpresszió szabályozása, és antivirális védelem (Matzke és Matzke, 2004; Mello és Conte, 2004). Ezek a funkciók számos útvonalon keresztül szabályozottak, amelyek közül csak a possztranszkripcionális géncsendesítésre (PTGS) térünk ki részletesebben.
Azt feltételezik, hogy ez a mechanizmus a növények vírusok és transzpozonok elleni védelmére alakult ki (Voinnet, 2001). Állati szervezetekben is leírtak a PTGS-hez nagyon hasonló folyamatot, amelyet RNS interferenciának (RNAi) neveztek (Fire és mtsi, 1998). A központi szerepet mindkettőben duplaszálú (ds) RNS-ek játsszák, amelyek általában nem fordulnak elő az eukarióta sejtekben. Ezek a molekulák a folyamat elindítói, melynek következő lépésében a dsRNS-eket egy dsRNS specifikus ribonukleáz (Dicer) hasítja rövid, 21-25 nt hosszúságú darabokra (Bernstein és mtsi, 2001). Mindazokban a növényekben, amelyekben a PTGS aktív, detektálhatóak ezek a kis RNS-ek, amelyeket másnéven rövid interferáló (short interfering, si-) RNS-eknek is neveznek (Elbashir és mtsi, 2001). A siRNS-ek beépülnek az ún. RNS-indukált silencing komplexbe (RISC), amely azután szekvencia-specifikus endoribonukleázként az egyszálú RNS célszekvenciát hasítani fogja. A folyamat során egy mobilis silencing szignál képződik, amely a szomszédos sejtekben is aktiválja az RNS silencinget. Ez a szignál feltételezések szerint maga a siRNS szabad vagy fehérjekomplex formában (Hamilton és Baulcombe, 1999; Lakatos és msti, 2004).
Minden olyan vírus, amely kettősszálú RNS intermedieren keresztül replikálódik, aktiválja a PTGS-t a növényekben. Evolúciójuk során ennek a mechanizmusnak a közömbösítésére a vírusok silencing szupresszorokat fejlesztettek ki, amelyek a folyamatot annak különböző pontjain gátolhatják. A leggyakoribbnak tűnő gátlási pont a ds siRNS-ek megkötése, ami által a szekvenciaspecifikus RISC kialakulása és a szignál terjedése is elmarad (Lakatos és mtsi, 2006). Ezt bizonyították a potyvírusok HC-Pro-ja, a tombusvírusok p19 fehérjéje és a closterovírusok p21-e esetében. A szuppresszorok siRNS kötésén kívül azonban más mechanizmusok létezését is feltételezik (Qu és mtsi, 2003).

A transzgén eredetű vírusspecifikus dsRNS-k expresszálódása a valós vírustámadáshoz hasonlóan aktiválja a növényi PTGS-t, azonban ilyenkor nincs jelen a vírus PTGS szupresszora, ezért a folyamatot semmi nem gátolja. Fertőzéskor az aktiválódott védekezőrendszerrel bíró sejtben a RISC rögtön képes a homológ szekvenciával rendelkező vírust specifikusan degradálni. Ez a magyarázata annak, hogy a dsRNS-t expresszáló transzgén konstrukciók alakítanak ki a leghatékonyabban vírusrezisztenciát, illetve inaktiválnak géneket amelyet több kísérletben is bizonyítottak (Waterhouse és mtsi, 1998; Smith és mtsi, 2000).

Ribozimok

A ribozimok olyan kis RNS molekulák, amelyek specifikus RNS-eket képesek *in trans* hasítani. Szatellit RNS-ekről vagy viroidokról származhatnak, de mesterséges ribozimok is előállíthatók. Van der Vlugt és mtsi (1993) mesterséges ribozimot terveztek a PVY RNS-függő RNS polimeráz kódoló régiójának konzervált része ellen, amellyel sikeresen hasították a transzkriptumot *in vitro*. Rezisztens Désirée burgonya vonalakról számoltak be Yang és mtsi (1997), akik a PSTVd RNS hasítását célozták meg egy mesterséges ribozimmal.

2.4.2. A vírusgének transzgénként való felhasználásának kockázati tényezői

A köpenyfehérje gént transzlálódó formában tartalmazó növényekben egy rokon vírustörzs felülfertőzése során kialakulhat a heteroenkapszidáció jelensége, amikor a felülfertőző vírus RNS-ét a transzgénből származó CP csomagolja be részben vagy egészben (Fuchs és Gonsalves, 2007). Kockázatot jelenthet, ha a transzgénről keletkező CP egy eredetileg vektorral nem terjedő vírus RNS-ének becsomagolásával a vírus ilyen módon való terjedését lehetővé teszi. A kockázat jelentősen csökkenthető csonkított köpenyfehérje gén beépítésével.
Másik kockázati tényező a transzgén RNS és a felülfertőző vírus RNS közötti rekombináció lehetősége. A vírusok közti természetes rekombináció ismert jelenség, hiszen egy fertőzött növényben gyakran egyszerre több vírustörzs van jelen. Revers és mtsi (1996) a CP+3'NTR-t vizsgálva azt találták, hogy a természetes rekombináció az általuk vizsgált 8 faj közül a PVY-ra a legjellemzőbb.
A transzgénikus növények és vírusok közti rekombináció kockázata két tényezőből, a rekombinációs gyakoriságból és a rekombináció által okozott veszélyből (pl. súlyosabb betegség kialakításának képessége) tevődik össze. A rekombinációs gyakoriság becslésére Dietrich és mtsi (2007) transzgénikus és nem transzgénikus növényeket fertőztek egy-, illetve

kétféle vírussal. Összesen 560 növényt megvizsgálva 4 héttel az inokulálás után egyetlen rekombináns potyvírus szekvenciát sem találtak, így arra a következtetésre jutottak, hogy a rekombináció gyakorisága nagyon alacsony. A kétféle típusú fertőzés azonban nem egyenrangú, mert míg a transzgénikus növényben a vírus eredetű szekvencia minden sejtben jelen van, a természetes kettős fertőzés esetén a két vírus majdem teljesen szeparáltan is jelen lehet (Dietrich és Maiss, 2003). Transzgénikus növényekben létrejött rekombináns CCMV-k új tüneteket alakítottak ki, bár Allison és mtsi (1999) vizsgálatai alapján azok a szülői törzseknél kevésbé életképesnek bizonyultak.

Szabadföldön évek óta termesztett, köpenyfehérjét expresszáló különböző növényfajok (tök, papaya, szőlő) vizsgálatai alapján azt a következtetést vonták le, hogy a beépített, vírusrezisztenciát kialakító konstrukciók nem jelentenek nagyobb környezeti kockázatot, mint egy természetes kevert vírusfertőzés (Fuchs és Gonsalves 2007). A biológiai biztonság szempontjából azonban legalkalmasabbnak a PTGS-en alapuló vírusrezisztencia létrehozása tűnik, mivel ennek során nem képződik fehérje, és RNS sem halmozódik fel, így a felülfertőző vírussal történő esetleges rekombináció valószínűsége igen csekély (Aaziz és Tepfer, 1999).

2.5. Fertőzőképes cDNS klónok alkalmazása

A fertőzőképes cDNS klónok lehetővé teszik az RNS vírusok, így a Potyvírusok genetikájának vizsgálatát inszerciós, delécios mutánsok, mutagenezis és komplementációs kísérletek segítségével. A potyvírusok genomszerkezetének pontos feltárása a vírusok nukleotid szekvenciájának ismeretével és a vírus RNS komplementer DNS-éről (cDNS) szintetizálódó fertőzőképes transzkriptumok létrehozásával vált lehetővé. Bár a vírusok patológiájáról a szekvenciaanalízis is szolgáltat információt, alaposabb vizsgálathoz kiméra vírusokra van szükség, amelyeket fertőzőképes cDNS klónok segítségével állíthatunk elő. Jól használhatók ezen kívül természetes vagy mesterségesen indukált RNS rekombinációk, defektív interferáló RNS-ek vagy szatelit RNS-ek képződésének tanulmányozásához, illetve a vírus mozgásának vizsgálatához a gazdán belül vagy különböző gazdanövények között (Boyer és Haenni, 1994).

A fertőzőképes cDNS klónokkal létrehozott mesterséges vírus kimérákkal az is vizsgálható, hogy a vírusszekvenciát hordozó transzgénikus növény rezisztencája áttörhető-e rekombináns genommal rendelkező vírus által.

2.6. Növényi transzformációs rendszerek

Genetikai transzformáció eredményeképpen létrejött transzgénikus növényekben a bevitt DNS a sejtmagban levő genomi DNS-be integrálódik. A transzformáció speciális esete, amikor DNS-t tartalmazó sejtorganellumokat célzunk meg, ekkor transzplasztomikus vagy transzmitokondriális növényekről beszélhetünk. Bármelyik típusú transzformáció speciális esete, ha a bevitt DNS ugyanazon fajból származik, mint a recipiens növény, ilyen esetekben cisz- vagy intergénikus növényekről beszélünk.

A géntranszfer leggyakoribb módja az agrobaktériumos fertőzés, amelyhez transzformációs vektorba épített transzgént tartalmazó *Agrobacterium* törzseket használnak. Direkt génbeviteli eljárások a biolisztikus módszer (génpuska), és a ritkábban alkalmazott kémiai (PEG-es) eljárás vagy az elektroporáció (Heszky és mtsi, 2005).

2.6.1. Szelekciós markerek és riporter gének

A transzformációs technikák segítségével a bevitt DNS a sejtek kis hányadában integrálódik a nukleáris DNS-be, ezért ezek számára a regenerációhoz előnyt kell biztosítani. Erre a célra szelekciós markereket alkalmazunk, amelyek a transzformációs vektor határszekvenciái között helyezkednek el. A leggyakrabban használt szelekciós markerek az antibiotikum- (pl. *nptII, hpt*), és herbicidrezisztencia gének (pl. *bar, EPSP*), amelyek expressziója következtében a transzformáns sejtek szelekciós táptalajon túlélnek és regenerálódnak, míg a többi elpusztul.

A szelekciós markerek másik csoportját képezik azok a gének, amelyek a transzformált sejteknek metabolikus előnyt biztosítanak. Ilyen például a foszfomannóz izomeráz, amely képessé teszi a sejteket a mannóz, mint cukorforrás hasznosítására (Boscariol és mtsi, 2003), a xilóz izomeráz (Haldrup és mtsi, 1998) és a 2-dezoxiglükóz-6-foszfát foszfatáz (Kunze és mtsi, 2001).

A transzformánsok vizuális elkülönítésére nyílik lehetőség a riporter gének expressziója következtében. A β-glükuronidáz (*gusA*) gén működését a szubsztrát hozzáadása után kék színreakció jelzi (Jefferson, 1989), a zöld fluoreszcens protein (GFP) tartalmú szövetek UV fényben zölden fluoreszkálnak (Chalfie és mtsi, 1994), a luciferáz (LUC) enzim működése pedig luciferin és ATP jelenlétében fénykibocsátással jár (Ow és mtsi, 1986). Fenotípusos elkülönítést tesznek lehetővé a hormonanyagcserét befolyásoló gének, mint a *rol A,B,C* (Ebinuma és mtsi, 1997b) gének, vagy az izopentenil foszfotranszferáz (*ipt*) gén (Ebinuma és mtsi, 1997a).

2.6.2. Markergének eliminálása

A szelekciós markerek használatával kapcsolatban a társadalom részéről számos aggodalom merült fel, például a herbicidrezisztencia gének rokon vad fajokba történő kikereszteződése, vagy az antibiotikum rezisztencia gének bejutása a bél- vagy a talajbaktériumokba. A legtöbb eddig készült veszélyességi hatástanulmány szerint ugyan ezek a gének nem jelentenek kockázatot, a biológiai biztonság fokozása azonban igen fontos, hiszen a transzgénikus növények társadalmi elfogadottsága a gyakorlati hasznosíthatóság egyik kritériuma (Ramessar és mtsi, 2007; Craig és mtsi, 2008).

Az előírásoknak és a társadalmi igényeknek megfelelően kívánatos az, hogy a GM növények a lehető legkevesebb idegen szekvenciát tartalmazzák. Az elsődleges cél a markerek teljes eliminálása. Eddig számos tanulmány született a marker gének elkerülésének vagy utólagos eltávolításának lehetőségére, és a fejlesztés alatt álló módszerek száma egyre nő (Puchta, 2003; Hohn és mtsi, 2001).

Az ideális megoldás szerint a transzgén konstrukció nem tartalmaz marker gént, ebben az esetben azonban a hajtások egyenkénti molekuláris tesztelésére van szükség, aminek feltétele egy jó hatékonyságú transzformációs rendszer. Aziz és Machray (2003) olyan dohány mikrospóra transzformációs módszert dolgozott ki, amelyben biolisztikus módszerrel 15 %-os transzformációs hatékonyságot értek el szelekcióval, illetve annak hiányában is. Permingeat és mtsi (2003) hét génbelövéses búza transzformációs kísérletben, szelekció hiányában 14 %-ban kaptak transzgénikus növényeket. De Vetten és mtsi (2003) szelekciós markert nem tartalmazó konstrukcióval transzformáltak burgonyát egy szupervirulens agrobaktérium törzzsel, és 1-5 % közötti hatékonysággal hoztak létre marker mentes transzgénikus burgonya vonalakat, amelyek azonosítása PCR reakcióval történt. A módszer hátránya, hogy a nagyszámú regenerált hajtás vizsgálata nagy munkaigényű, és magas költséggel jár.

A marker gének utólagos eltávolításának egyik módszere a két gén független beépülését (ko-transzformációt) követő szegregációt használja fel (Komari és mtsi, 1996). A módszer hátránya, hogy a marker kiejtéséhez fertilis növényekre van szükség, így a vegetatívan szaporított növényfajok esetében – amilyen a burgonya is – a marker gén kikeresztezése meglehetősen nehézkes eljárás.

Másik lehetőség a marker gén kivágása a genomból. A mikrobiális helyspecifikus rekombináz enzimek segítségével lehetőség van bizonyos szekvenciák célzott eltávolítására vagy beépítésére. Több ilyen rendszert ismerünk, a leggyakrabban használt a P1 fág Cre/*lox* rendszere (Dale és Ow, 1991), de ismert az élesztő 2 μ plazmidjáról származó FLP/*ftr* (Kilby és mtsi, 1995), vagy a *Zygosaccharomyces rouxii* R-*RS* rendszere (Onouchi és mtsi, 1995) is.

Ezek közös jellemzője, hogy amint az enzim expresszálódik, a rekombinációs reakció elindul és a két rekombináz felismerőhely között elhelyezkedő marker gén kivágódik. Sok esetben azonban a kivágódás nem komplett, vagy kiméra növények keletkezhetnek (Schaart és msti, 2004; Ballester és mtsi, 2007). A rekombinációt előidézhetjük rekombinázt expresszáló növénnyel történő keresztezéssel, egy második transzformáció utáni rekombináz expresszióval, indukálható promóterrel, vagy vírusvektorba épített rekombináz tranziens expressziójával (Jia és mtsi, 2006).

További lehetőség a marker gének eltávolítására a homológ rekombináció, mely elsősorban prokariotákra jellmző. Ez az oka annak, hogy gyakorisága a kloroplasztisz genomban magas, így alkalmazása kloroplaszt transzformációban hatékony (Day és mtsi, 2005). A sejtmagi homológ rekombináció gyakorisága növelhető ritkán hasító enzimek felismerőhelyeinek marker mellé történő beépítésével. Ez a mechanizmus jó alternatíva lehet a marker gének „kivágására", ugyanis nem hagy „maradék" idegen szekvenciát a genomban, míg a helyspecifikus rekombinázok felismerőhelyei megmaradnak (Puchta, 2003).

Transzpozábilis elemek közé épített marker gén transzpozáz általi kivágásával is elérhető a marker elvesztése, azonban a rendszer hátránya, hogy ez nagyon kis gyakorisággal fordul elő (Ebinuma és mtsi, 1997a).

Rommens és mtsi (2004) újszerű megközelítést alkalmaztak marker-mentes burgonya- és dohánynövények előállítására. Abból a feltételezésből indultak ki, hogy két különböző T-DNS együttes bejutása a növényi sejtbe nem jelenti feltétlenül azt, hogy mindkettő integrálódik is a genomba. A pozitív szelekciós marker gént (*nptII*) hordozó T-DNS tranziens expressziója következtében azok a sejtek is túlélnek a szelekciós médiumon, amelyekből esetleg később ez a gén elvész, míg a másik vektoron elhelyezkedő hasznos gén beépül. Az *nptII*-höz egy negatív szelekciós markert kapcsolva, a markereket hordozó transzformánsok későbbi eliminálásával a marker mentes vonalak aránya jelentősen nőtt. Ilyen pozitív-negatív szelekciós rendszerű, polifenol oxidáz silencing konstrukciót hordozó vektorral transzformálva 5,4 %-ban kaptak marker és vektor szekvenciától mentes, csak a hasznos gént expresszáló burgonya hajtásokat. Szintén kapcsolt pozitív-negatív szelekciót alkalamaztak Kondrák és mtsi (2006) az általuk kidolgozott, egy T-DNS határszekvenciát tartalmazó PROGMO vektoron alapuló burgonya transzformációs rendszerben.

2.6.3. A burgonya transzformációja és regenerációja

Az első burgonya transzformációs kísérletek eredményei már a 80-as évek elején napvilágot láttak. Kallusz állapot közbeiktatásával állítottak elő transzgénikus hajtásokat (An és mtsi,

1986) ez a módszer azonban a szomaklonális variábilitásnak kedvez, így gyakran kiméra növények keletkeztek (Thomas és mtsi, 1982). A direkt regenerációs rendszerek kidolgozásával a transzformánsok előállításának ideje lerövidült és a kallusz okozta problémák is elkerülhetővé váltak.

A regenerációs és a transzformációs ráta alakulására az explant típus, agrobaktérium törzs, táptalaj, egyéb nevelési körülmények, és a genotípus lehet hatással. Az explant típus szerepét vizsgálva Visser és mtsi (1989) azt tapasztalták, hogy az internódiumokon lassabban regenerálnak hajtások, de ezek 6 hét elteltével utolérték a levélen regenerált hajtásokat, és a transzformációs rátájuk is magasabb lett. Hansen és mtsi (1999) növényházból származó fiatal burgonyalevelekből kimetszett darabokat transzformáltak, és összefüggést figyeltek meg a hatékonyság és a levél kora, valamint aközött, hogy az explant a kifejlett burgonyalevél mely részéből származott. A fiatalabb levelek egyes levélkéinek proximális részéből hatékonyabb regenerációt kaptak, mint az idősebb levelek disztális részéből. Génbelövéssel transzformálva különböző szövettípusokat Romano és mtsi (2003) eredményei szerint a legjobb az internódium, míg a gumószelet és a levél kevésbé jól regeneráló explant.

A nevelési körülmények hatását és a kiindulási növényanyag állapotának kritikus szerepét hangsúlyozzák Banerjee és mtsi (2006) *S. tuberosum ssp. andigena* esetében, jóllehet e tényezők szerepét a burgonya transzformációs rendszerekben már kiemelték (Wenzler és mtsi, 1989).

A különböző genotípusok különböző válaszadó képességét jól példázzák Hansen és mtsi (1999) eredményei. Három burgonyafajta regenerációs rendszerét optimalizálva a Posmo esetében 97 %-os, a Folva fajtánál 32 %-os regenerációs rátát értek el, míg az Oleva fajtánál nem jártak sikerrel. Hulme és mtsi (1992) egy genotípus független levél transzformációs rendszert dolgoztak ki burgonyára korábban közölt módszerek felülvizsgálatából kiindulva. Számos egy-, két-, és háromlépéses regenerációs protokoll alapján az általuk vizsgált nyolc genotípus esetében leghatékonyabbnak az a kétlépéses módszer bizonyult, amelyben magas auxin- és citokininkoncentrációs előkezelést alkalmaztak ezüst-tioszulfáttal együtt.

A genotípus a regenerációs képesség mellett a transzformációs rátára is bizonyosan befolyással van. Sheerman és Bevan (1988) öt burgonyafajta transzformációja során háromnál jártak sikerrel. A gumószeletek 6-20 %-án kaptak normális fenotípusú hajtásokat szelekciós táptalajon 4 hét után.

2.6.4. A hajtásregenerációt serkentő gének szerepe a marker mentes transzformációban

A vegetatív sejteknek csak kis hányada képes felnőtt növénnyé regenerálódni. A vegetatív állapotból az organogén vagy embriogén állapotba való átmenetet szabályozó mechanizmusokban a növényi hormonok által aktivált jelátviteli kaszkádoknak, amelyek sejtosztódást és differenciációt indítanak el, fontos szerepük van.

Az antibiotikum rezisztenciagénekkel kapcsolatos aggodalmak és problémák miatt már korán felmerült, hogy a regenerációt elősegítő hormonok szintézisében szerepet játszó gének a hagyományos antibiotikum rezisztencia markereket kiválthatják azáltal, hogy megfelelő körülmények között csak a regenerációt serkentő gént tartalmazó sejtek képesek regenerálódni növényi hormonok hiányában.

Az *Agrobacterium tumefaciens* onkogénjeinek egyike, az *ipt* gén az antibiotikum marker mentes transzformáció céljából az egyik leggyakrabban kísérletbe vont regenerációt serkentő gén. Az *ipt* gén terméke az izopentenil foszfotranszferáz enzim, amely a citokinin bioszintézis első intermedierjének, az izopentenil-adenozin-5-monofoszfátnak a kialakulását katalizálja (Barry és mtsi, 1984). A növényi citokininek a növény fejlődése során egy sor morfológiai és fiziológiai változásban szerepet játszó hormonok (Davies, 1995; Coenen és Lomax, 1997), emellett fontos szerepük van a járulékos hajtások képződésében. Elsőként Skoog és Miller (1957) számoltak be arról, hogy a magas citokinin koncentráció dohány kalluszból járulékos hajtásregenerációt indukál. Az *ipt* gént a CaMV 35S promótere mögé építve Smigocki és Owens (1988) azt találták, hogy az enzim túltermelődése a transzgénikus növényekben intenzív hajtásregenerációt és magas citokinin szintet eredményez, ami az internódiumok redukciójához, a levélmorfológia megváltozásához és késleltetett szeneszcenciához vezet. A legtöbb ilyen transzgénikus regeneránsban a gyökérképződés redukált és a növények gyakran sterilek.

A probléma kiküszöbölésére a 2.6.2. pontban említett megoldások közül számosat alkalmaztak. Ebinuma és mtsi (1997a) a kukorica Ac transzpozábilis elemei közé inszertálták az *ipt* gént, és az abnormális növények egy részéből normális fenotípusú regeneránsokat kaptak. A rendszer nagy hátránya, hogy az Ac elem elvesztése nagyon kis gyakorisággal fordul elő (0,1-0,5 %). Emellett az ilyen növények regenerálódása lassú folyamat, és nehéz azokat fenotípusosan megkülönböztetni az *ipt*-t alacsony szinten expresszáló vagy kiméra növényektől. A Sugita és mtsi (1999) által kidolgozott R/RS MAT vektor rendszer alkalmazásával mások mellett Ballester és mtsi (2007) az *ipt* hatékonyabb kivágását érték el. Kunkel és mtsi (1999) egy szigorúan szabályozott, dexametazon által indukálható promóterrel

kapcsolt *ipt* gén felhasználásával dolgoztak ki antibiotikum-marker mentes transzformációs rendszert.

Az utóbbi időben a magasabbrendű növények citokinin termelési útvonalait és citokinin szignál transzdukciós kaszkádjait is elkezdték feltérképezni. Zuo és mtsi (2000) *Arabidopsis*ban azonosították a *PGA22* gént, aminek a túltermeltetése a bakteriális *ipt*-hez hasonló, tipikus citokinin válaszban nyilvánult meg. Emellett Takei és mtsi (2001) és Kakimoto (2001) egymástól függetlenül számos *ipt*-szerű *Arabidopsis* gént (*AtIPT*) azonosítottak szekvencia adatbázisokból, és kísérletekkel igazolták ezek funkcionális *ipt* jellegét. A „növényi *ipt*-k" transzformációs vektorokban való használatának előnye a várható kedvezőbb társadalmi megítélés mellett az, hogy ezek a gének növényekben feltehetően hatékonyabban működnek, mint egy bakteriális gén.

A citokinin szignál transzdukciós kaszkád manipulációja a növényi *ipt*-k alkalamazásánál is hatékonyabbnak ígérkezik. Ennek alapja, hogy míg a túltermelődött citokininek feltételezhetően a szomszédos, nem transzformált sejtebe is bejutnak, és regenerációt indukálnak „escape" hajtásokat létrehozva, addig a sejtben specifikusan lokalizált fehérjék migrációja nem valószínű. Zuo és mtsi (2000) a *CKI1* (*cytokinin independent 1*) receptor-szerű hisztidin kináz gént használták fel marker-mentes transzformáció céljára azt feltételezve, hogy így a szomszédos sejtekbe történő citokinin migráció minimális lesz. Valóban nem kaptak „escape" hajtásokat, azonban a gén konstitutív expressziója esetén itt is abnormális hajtások képződtek. Egy β-ösztradiol által indukálható promóterrel kombinált rendszerben azonban normál fenotípusú hajtásokat nyertek nem induktív táptalajra történt transzfer után (Zuo és mtsi, 2002).

A merisztéma fejlődésében szerepet játszó, és az organogenezishez nélkülözhetetlen többi gén közül számos potenciálisan alkalmazható lehet marker mentes transzgénikus növények előállításához a jövőben.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Anyagok és módszerek transzgénikus, PVY rezisztens burgonyavonalak előállításához

3.1.1. Baktérium törzsek, plazmidok, vírustörzs

A transzgén konstrukció előállításához az *Escherichia coli* DH5α törzsét, a növényi transzformációhoz pedig az *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 törzs pGV3170 Ti plazmidot hordozó mutáns változatát használtuk, melyet a továbbiakban GV3170-ként (Amp^R) említünk. A mutáns pGV3170 plazmidon az 1, 2 és 5-ös, az auxinszintézisben résztvevő onkogének transzpozon inszerció következtében inaktiváltak, a 4-es, ipt gén azonban működőképes (Holsters és mtsi, 1980), ezért a GV3170 törzs ún. shooter, azaz hajtásindukáló mutáns.

A transzformációs vektor előállításához a következő plazmidokat használtuk: pBluescriptKSII+ (Fermentas), Amp^R és pRGGneo (Mihálka és mtsi, 2000), Km^R.

A transzgén konstrukciót hordozó baktérium törzset GV3170YCP névvel jelöltük.

A pRGGYCPiPCY növényi transzformációs vektort Höfgen és Willmitzer (1988) módszere szerint hősokkal juttattuk be agrobaktériumba.

Az *E. coli*-t antibiotikumokkal kiegészített LB táptalajon növesztettünk 37 °C-on. Az agrobaktériumot antibiotikumokkal kiegészített YEB táptalajon növesztettük 28 °C-on.

A transzgén konstrukció készítéséhez a PVY^{NTN} vírustörzshöz tartozó PVY-H magyar izolátumot (Thole és mtsi, 1993, GeneBank acc. nr. M95491) használtuk.

3.1.2. Molekuláris biológiai anyagok, módszerek

A molekuláris biológiai munkák során használt reagensek (enzimek, nukleotidok, pufferek, méretmarkerek) a Fermentas cég termékei. Az ettől való eltéréseket külön jelöljük. A primereket a Biomi Kft. készítette. Az amplifikációt minden esetben GeneAmp PCR System 9700 készüléken (Applied Biosystems) végeztük.

3.1.2.1. Primerek

A növényi transzformációs vektor készítéséhez, és a potenciálisan transzformáns burgonyavonalak vizsgálata során használt PCR primereket a 3.1 táblázat mutatja be.

3.1 táblázat. A transzgénikus, PVY rezisztens burgonyavonalak előállítása és vizsgálata során használt primerek. A szekvenciában az aláhúzott részek a primer nevében megjelölt restrikciós hasítóhelyeket, a kisbetűs rész pedig SacI hasítóhelyet jelöl.

Primer pár	Szekvencia	Fragment méret	Annellálási hőmérséklet	Célszekvencia
Y8819_BamHI Y9639_SacI	5'GCGGATCCCTCGAGCAACTCAATCACAG3' 5'GCGAGCTCCAGACATAGTCACTGCTACG3'	820 bp	64 °C	PVY CP gén
Y8819_HindIII Y9639_EcoRI	5'AAAAGCTTgagctcGAGCAACTCAATCACAG3' 5'GCGAATTCCAGACATAGTCACTGCTACG3'	820 bp	64 °C	PVY CP gén
p1 p2	5'TAGAGCTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATAC3' 5'GCGAATTCCAGACATAGTCACTGCTACG3'	820 bp	58 °C	PVY CP gén
ipt for: *ipt* rev:	5'ATTTTCGGTCCAACTTGCAC3' 5'CCTCCCTCAAGAATAAGCCC3'	278 bp	60 °C	*ipt* gén
cheA for: *cheA* rev:	5'TGGATATGAACGAAATCAAG3' 5'GTAGGCATCTTCCATCGCGG3'	928 bp	51 °C	*Agrobacterium cheA* gén
HCPro_for HCPro_rev	5'GGGCACAAATGAGATATCCTACAGA3' 5'TTTCTAGACTCAGATCAACCGGTTC3'	297 bp	55 °C	PVY HC-Pro gén

3.1.2.2. Növényi transzformációs vektor készítése

A vektor konstrukció készítése (PCR, ligálás, restrikciós emésztések, plazmid izolálás és *E. coli* transzformáció) standard molekuláris technikák alkalmazásával történt (Sambrook és mtsi, 1989). Az ettől való eltérések a következők:

cDNS készítés (reverz transzkripció):

100 ng templát RNS (3 µl) és 3,75 µl 20 pmol/µl Y9639_SacI primer elegyét 65°C-on denaturáltuk 5 percig, majd jégre tettük 5 percre, azután hozzáadtuk a következőket:

2 µl 5x M-MuLV reverz transzkriptáz puffer, 1 µl dNTPmix (mindegyikre 5 mM), 40 U M-MuLV reverz transzkriptáz.

A reakciót 1 óráig inkubáltuk 42°C-on, majd ebből 3 µl-t használtunk templátként a PCR-hez. Az amplifikálás a Y8819_BamHI és Y9639_SacI, illetve a Y8819_HindIII és Y9639_EcoRI primerekkel (3.1 táblázat) a következő PCR program szerint történt:

94°C 2min, (94°C 30sec, 45°C 30sec, 72°C 1min) 5 ciklus, (94°C 30sec, 64°C 30sec, 72°C 1min) 30 ciklus, 72°C 7min.

A reakció összetétele a következő volt:

3 µl cDNS, 2-2 µl 20 pmol/µl primer, 8 µl dNTPmix (mindegyikre 5mM), 20 µl 10x PCR puffer, 12 µl 25 mM $MgCl_2$, 2 U Taq polimeráz, 200 µl-re kiegészítve steril MilliQ vízzel.

A transzgén konstrukció klónozásának leírása az Eredmények fejezetben található.

3.1.2.3. Növényi DNS izolálás

PCR teszteléshez CTAB módszerrel izoláltunk DNS-t (Weigel és Glazebrook, 2002) *in vitro* minta esetében egy-két levélből, növényházi minta esetén Eppendorf cső fedelével vett levélkorongból.
Southern analízishez a növényi genomiális DNS-t Sharp és mtsi (1988) módszere szerint izoláltuk 2 g növényi szövetből kiindulva.

3.1.2.4. RNS izolálás vírusfertőzött növényből

Az összRNS-t növényenként két-két, Eppendorf cső fedelével vett levélkorongból izoláltuk, RNeasy Plant Mini Kit-tel (Qiagen) a gyártó utasításai szerint.

3.1.2.5. Regenerált hajtások vizsgálata PCR-rel

A PCR reakció összetétele:
100 ng templát DNS, 2,5 µl 10x PCR puffer, 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 1 µl 20 mM dNTPmix, 0,5-0,5 µl 10 pmol/µl primer (p1/p2, *ipt* for/*ipt* rev, vagy *cheA* for/*cheA* rev, 3.1 táblázat), 1 U Taq polimeráz, 25 µl-re kiegészítve steril MilliQ vízzel.
A PCR paraméterei a következők voltak:
94 °C 3 min, (94 °C 45 sec, 58 °C* 45 sec, 72°C 45 sec**) 35 ciklus, 72 °C 5 min.
* a használt primernek megfelelő hőmérséklet (3.1 táblázat)
** a termék hosszának megfelelő idő
A PCR terméket 1 %-os agaróz gélen detektáltuk.

3.1.2.6. Víruskimutatás RT-PCR-rel

A PVY kimutatásához a reverz transzkripciót és a PCR-t egy reakcióelegyben végeztük, melynek összetétele a következő volt:
50 ng templát RNS, 5 µl 10x PCR puffer, 5 µl 25 mM $MgCl_2$, 2 µl 20 mM dNTPmix, 1-1 µl 10 pmol/µl primer (HCPro_for/HC-Pro_rev), 1 U Taq polimeráz, 10 U M-MuLV reverz transzkriptáz, 50 µl-re kiegészítve steril MilliQ vízzel.
Az amplifikáció paraméterei a következők voltak:
42 °C 45 min (reverz transzkripció), 94 °C 3 min, (94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 45 sec) 35 ciklus, 72 °C 5 min.

A fragmenteket 1 %-os agaróz gélen detektáltuk.

3.1.2.7. A transzgén genomi integrációjának vizsgálata Southern analízissel

Az éjszakán át NdeI enzimmel emésztett kb. 30 µg genomi DNS-t 0,7 % agaróz gélben TBE pufferben szeparáltuk. A transzferhez való előkészítéshez a gélt először 15 percig 0,25 M HCl-ben (depurinálás), majd 15 percig 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH-ban rázattuk óvatosan, végül 15 percig 1,5 M NaCl/0,5 M TrisHCl-ban (pH 8,0) semlegesítettük. A DNS-t egy éjszakán keresztül blottoltuk Hybond N+ membránra (Amersham) 20x SSC-ben (175,3 g/l NaCl, 88,2 g/l Na-citrát, pH 7,0). Az YCP hibridizációs próbát a transzgén konstrukcióról a p1/p2 primerekkel (3.1 táblázat) amplifikált 820 bp hosszú PCR termékből készítettük. A tisztított PCR terméket [α-32P]dCTP-vel radioaktívan jelöltük a gyártó utasítása szerint (HexaLabel DNA Labeling Kit, Fermentas). A hibridizálást 65 °C-on végeztük. Egy órás, Church pufferben (Church és Gilbert, 1984) történő prehibridizáció után a membránt a jelölt próbával egy éjszakán át hibridizáltattuk. Másnap a membránt egyszer mostuk A pufferrel (5 % SDS, 40 mM $NaHPO_4$, 1 mM EDTA), majd kétszer B pufferrel (1 % SDS, 40 mM $NaHPO_4$, 1 mM EDTA) 20-20 percig 65 °C-on. A jelet Phosphor Image Screen-nel detektáltuk (Molecular Dynamics), amelyet Storm 840 Phosphorimaging rendszerrel olvastunk le (Amersham).

3.1.3. Növényi anyagok, módszerek

3.1.3.1. Növényi anyag

A transzformációs kísérletekhez négy magyar és egy amerikai burgonya fajtát használtunk: *Solanum tuberosum* L. cv. Mindenes, cv. Kisvárdai Rózsa, cv. Gülbaba, cv. Somogyi kifli és cv. Russet Burbank. A növények a Pannon Egyetem (Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar) Burgonyakutatási Osztályának génbankjából, Keszthelyről származtak. A növényanyagot steril *in vitro* gyökeres hajtások formájában kaptuk.

3.1.3.2. Növények fenntartása steril tenyészetben

A magyar fajtákat felváltva MS, illetve MS minimál táptalajon, míg a Russet Burbank fajtát MS minimál táptalajon tartottuk fenn.
A transzformációra alkalmas növényanyag előállításának optimális fenntartási körülményei a következők voltak: nagy légterű, jól szellőző edény (500 ml-es Erlenmeyer lombik

vattadugóval), 100-120 ml táptalaj/lombik, max. 8 növény/lombik, 16 h megvilágítás, OSRAM Fluora és Tungsram F29 csövek fele-fele arányban (fényszoba összmegvilágítása kb. 2000 lux), 20-22 °C-os hőmérséklet. Fenntartáshoz 6 hetente a hajtások 2-3 cm-es csúcsát sterilen lemetszettük és friss táptalajba helyeztük.

3.1.3.3. Növényi transzformáció és regeneráció

A burgonya transzformációhoz a GV3170YCP törzset YEB+$Amp_{100}Km_{50}$ lemezen növesztettük. A friss lemezről egy telepet fogpiszkálóval levéve 10 ml folyékony YEB+$Amp_{100}Km_{50}$ táptalajba oltottuk és rázatva inkubáltuk egy éjszakán át. Következő reggel 1 ml kultúrát 10 ml AB minimál+$Amp_{100}Km_{50}$ táptalajba oltottunk és 6 órán át rázatva növesztettük (OD 0,6-0,8), majd ezt a tenyészetet használtuk a transzformációhoz.
A transzformációkhoz a 3-4 hetes növények 0,8-1 cm-es szárszegmenseit (internódiumokat) és 0,8-1,5 cm^2-es leveleit 2-3, főérre merőleges bemetszéssel 20 ml folyékony MSB5 táptalajra helyeztük Petri csészébe, majd 500µl agrobaktérium szuszpenziót adtunk hozzá. Két napos, szobahőmérsékleten történő együtt tenyésztés után az explantokat minimum 2 órán át mostuk folyékony MSB5+Cef_{500} táptalajjal, majd szilárd MSB5+Cef_{500}-ra helyeztük úgy, hogy minden Petri csészébe 20 internódium vagy 10 levéldarab került. A Somogyi kifli esetében a módszer eltérő volt: itt a regenerációs fázisban MS1/2vit+Cef_{300} táptalajt használtunk.
Az explantokat háromhetente friss, cefotaximos MSB5-re tettük át. A regeneráció megindulása után az egy-másfél cm-es hajtásokat leválasztottuk az explantról és MS+Cef_{300}-ra tettük gyökereztetés céljából. Az agrobaktérium eliminálása érdekében a hajtásokat háromszor, három hetes időközönként friss MS+Cef_{300} táptalajra raktuk át. A negyedik átrakás antibiotikum-mentes táptalajra történt, ami lehetővé tette az esetleg túlélő agrobaktérium detektálását néhány napon belül. A molekuláris vizsgálatokhoz a mintaszedés a hajtások negyedik, antibiotikum mentes táptalajra való átrakása után történt. Ekkortól az anyagot egyedileg sorszámozva, kémcsövekben neveltük tovább.

3.1.3.4. Transzformáns növények nevelése rezisztencia teszthez

A rezisztencia teszt elvégzéséhez szükséges, növényházban nevelt fiatal burgonyanövényeket kétféle módon állítottuk elő: minigumók hajtatásával (Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba és Russet Burbank), illetve a Somogyi kifli esetében palánták kiültetésével.

3.1.3.4.1. Minigumó indukciós kísérletek

Fajtánként 9-10 burgonya vonallal dolgoztunk. *In vitro* felszaporítás után az indukciót két módszerrel végeztük: (1) folyadékban, két lépésben és (2) szilárd táptalajon, egy lépésben.
(1) Kétlépéses, folyadékos indukcióhoz a hathetes növényanyagot kétrügyes darabokra vágtuk, és 20-30 db-ot műanyag növénynevelő dobozban (Veg box, Duchefa) 40 ml folyékony MS táptalajon neveltünk kb. 3 hétig fényszobában 20-22 °C-on. Ezután az MS táptalajt lecseréltük folyékony gumóindukciós táptalajra és a megvilágítási periódust 16-ról 8 órára csökkentettük.
(2) Az egylépéses indukciónál a növényeket 6-8 hétig neveltük 500 ml-es Erlenmeyer lombikban (6-8 növény lombikonként) fenntartáshoz használt táptalajon, majd szétszedés nélkül átraktuk Veg boxba szilárd gumóindukciós táptalajra.
Az indukálódott minigumókat az alábbiak szerint neveltük tovább: a gumókat a növényen hagyva további 4-8 hét érési időszakot biztosítottunk sötétben, majd a növényről leválasztott gumókat megfelelő parásodás után hűtőszekrényben, 10 °C-on további 6 hétig pihentettük.
A gumókat méret és érési állapot szerint osztályoztuk, majd vonalanként 10, illetve 5 darabot Jiffy 7-es tőzegpogácsába (Jiffy International AS) ültettünk. Két hétig fényszobában, hajtató ládában neveltük, majd növényházba ültettük ki őket.

3.1.3.4.2. Palántanevelés

A Somogyi kifli fajtából regenerált *in vitro* gyökeres burgonya hajtásokat ültettünk ki Jiffy7 tőzegpogácsába. A nevelés fényszobában történt, majd a növények megerősödése után üvegházban, természetes fényviszonyok között, 21-25°C-on, cserépben neveltük tovább őket.

3.1.4. Virológiai anyagok, módszerek rezisztenciavizsgálathoz

3.1.4.1. Vírustörzs

A rezisztencia vizsgálatokhoz ugyanazt az izolátumot (PVY-H, Thole és mtsi, 1993) használtuk, amelyből a transzgén konstrukció készült.

3.1.4.2. Transzformáns növények fertőzése PVY-nal

Növényházba kiültetett, 8-10 leveles PCR-pozitív burgonya vonalakat mechanikailag inokuláltunk PVY-nal fertőzött dohány (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc) levél vizes kivonatával. 0,1 g levelet eldörzsöltünk 1 ml steril vízben jégen és ezzel inokuláltunk növényenként 2-3, előzőleg celite porral beszórt levelet.

3.1.4.3. A vírus kimutatása, vírusrezisztencia igazolása

Két héttel az inokulálás után a növényekből RNS-t vontunk ki, majd RT-PCR vizsgálatot végeztünk a 3.1.2.4. és 3.1.2.6. pontokban leírtak szerint. Ezzel párhuzamosan egészséges dohánynövények visszafertőzését is elvégeztük. Ehhez az inokulált burgonya növények egy-egy szisztemikus levélkéjét steril vízben jégen eldörzsöltük, majd celite porral előzőleg beszórt fiatal *N. tabacum* cv. Xanthi növények 2-2 levelét inokuláltuk.

3.2. Anyagok és módszerek hibrid PVY klónok előállításához és vizsgálatához

3.2.1. Baktérium, vírusok

A hibrid klónok készítéséhez a németországi DSMZ (http://www.dsmz.de/) vírusgyűjteményéből származó PVY^{NTN} (DSMZ acc. nr. PV-0403) és PVY^{O} (DSMZ acc. nr. PV-0343) törzsekhez tartozó vírusizolátumokat használtuk. (A továbbiakban az egyszerűség kedvéért PVY^{NTN} és PVY^{O} izolátumok). A PVY^{NTN} izolátum a megjelölés szerint eredetileg Magyarországról származik, a PVY^{O} izolátum pedig Németországból, mindkettő burgonyáról. A klónozáshoz az *E. coli* NM522 törzsét használtuk.

3.2.2. Molekuláris biológiai anyagok, módszerek

3.2.2.1. Plazmidok, klónozási technikák

A munka során a Jakab és mtsi (1997) által előállított PVY-N605 teljes, fertőzőképes cDNS klón 3 intront tartalmazó változatát használtuk [PVY-N605(123), Bukovinszki és mtsi, 2007]. A klónozás standard molekuláris technikákkal történt, a klónozás első lépéséhez a pGEM-T Easy vektort (Promega), majd a SPH83'pA plazmidot (Jakab és mtsi, 1997) használtuk. A

vírusszekvenciák amplifikálásához használt 6a és 6as primerek szekvenciáit a 3.2 táblázat mutatja be. A klónozás részletes leírása az „Eredmények” fejezetben található.

3.2.2.2. RNS izolálás

Az ELISA pozitív és tüneteket is mutató növények egy-egy szisztemikus leveléből a fertőzés után 24 nappal összRNS-t izoláltunk Menzel és mtsi (2002) módszere szerint.

3.2.2.3. RT-PCR

A vírus szisztemizálódását reverz transzkripciót követő PCR-rel erősítettük meg. Az RT-PCR reakció paraméterei és a reakcióelegy összetétele megegyezik a 3.1.2.5. pontban leírtakkal, az annellálási hőmérsékletet a primerekhez, az elongációs időt a PCR termék méretéhez módosítva. A vizsgálatot a HC-Pro génre és a CP génre tervezett primerekkel végeztük el (3.2 táblázat).

3.2 táblázat A hibrid klónok előállítása során a PVY^{NTN} és PVY^{O} 3’ végi szakaszának amplifikálásához, illetve a PVY RT-PCR-rel történő kimutatásához használt primerek.

Primer	Szekvencia	Várt méret	Anellálási hőmérséklet
6s 6as	5’ATGGCGCGCCAGATCTTGGTTTGAACTATG3’ 5’AGGGGTACCGGGCCCCCCCTCGAGTTTTTTTTT-TTTTTTTTTTTTTGTCTCCTGATTGAAGTTTAC3’	1568 bp	55 °C
HCPro1082_for: HCPro1841_rev:	5’GGGCACAAATGAGATATCCTACAGA3’ 5’TCACCTTTCATCTTCCGCCTAAAC3’	760 bp	55 °C
CP8503_for: CP9701_rev:	5’AAGGATCCGCTTTCACTGAAATGATGG3’ 5’AGGGAAGCTTCTAGAGTCTCCTGATTGAAG3’	1200 bp	60 °C

3.2.2.4. Vírusok azonosítása restrikciós emésztéssel

A hibrid, illetve szülői vírusok azonosítása céljából az RT-PCR termékeket TruI1 (MseI) restrikciós enzimmel emésztettük 1 óráig 65 °C-on, majd 1,8 %-os agaróz gélen vizsgáltuk a fragmenteket.

3.2.2.5. DNS szekvenálás

A pGEM-T Easy vektorba klónozott vírus eredetű cDNS-ek szekvenálását az MWG Biotech AG végezte. A templát 5 µl tisztított plazmid, a szekvenáló primerek a standard M13 uni és M13 rev primerek voltak.
A hibrid és a szülői vírusokkal fertőzött dohányból számos passzálás után ismét meghatároztuk a CP8503_for és CP9701_rev primerek által amplifikált vírus eredetű cDNS szakasz nukleinsav sorrendjét. Ezt a szekvenálást az amplifikációs primerekkel a Biomi Kft. végezte tisztított PCR terméket használva templátként.

3.2.3. A hibrid PVY klónok fertőzőképességének vizsgálata

A hibrid vírus cDNS-ek fertőzőképességét és stabilitását biolisztikus inokulálással (bombarding) teszteltük. Az inokuláláshoz a DNS-t Dietrich és Maiss (2002) módszere alapján készítettük elő. Egy növény inokulálásához a következő keveréket készítettük:

3 µl (kb. 200 ng) plazmid DNS
3 µl Wolfram partikulum (d = 1,1 µm, BioRad)
3 µl $Ca(NO_3)_2$ (1 M, pH 10)
Σ 9 µl

Alapos vortexelés után 5 percig ülepítettük a részecskéket, majd 6 µl felülúszó leszívása után a maradék 3 µl-t lőttük be *N. benthamiana* tesztnövényekbe Gray és mtsi (1994) alapján a Hannoveri Egyetem Növényvédelmi és Növénykórtani Intézetében (IPP) készített „génpuska" segítségével. Kísérletenként és konstrukciónként 3-5 db, 4-6 leveles korban lévő növényt használtunk. Kontrollként minden belövési kísérlet során az eredeti PVY-N605(123) klónnal is inokuláltunk.

3.2.3.1. DAS-ELISA

Biolisztikus eljárással inokulált növények fiatal, nem inokulált leveleiből két héttel a fertőzés után mintát vettünk, majd Clark és Adams (1977) szerint DAS-ELISA módszerrel mutattuk ki a vírust. A PVY poliklonális antitest a Loewe Biochimica-tól származott. Az abszorbanciát 405 nm-en mértük Microplate Reader Model 550 (BioRad) készülékkel.

3.2.4. Növényi anyagok, módszerek

3.2.4.1. Gazdanövény teszthez használt növényfajok és fajták

Nicotiana benthamiana Domin, *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc, *Nicotiana glutinosa* L., *Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank, *Physalis pubescens* L., *Physalis floridana* Rydb.

3.2.4.2. Gazdanövény teszt

Három-hat leveles növényeket mechanikailag inokuláltunk *N. benthamiana*-ban felszaporított hibrid (PVY-N/NTN, PVY-N/O) és szülői vírusokkal (PVY^{N}, PVY^{NTN}, PVY^{O}) a 3.1.4.2. pontban leírtak szerint. A növényeket ezután 21-25 °C-on neveltük növényházban természetes fényviszonyok között. A kísérletet háromszor ismételtük.
A kísérletek során a különböző gazdanövényeken minden fertőzési kísérletben ellenőriztük a vírusok azonosságát a 3.2.2.3. és 3.2.2.4. pontban leírt RT-PCR - restrikciós emésztéses vizsgálattal.

3.2.4.3. Transzformáns burgonyavonalak rezisztencia vizsgálata

A rezisztencia vizsgálatokhoz a Mindenes és Gülbaba fajtákból a MIN5.1.62., MIN4.2.50., valamint a GB4.2.31 transzformáns vonalakat választottuk ki.
Inokulumként *N. benthamiana* növényekben fenntartott vírusokat használtunk. Négy-öt, növényházban nevelt, 6-12 leveles burgonyanövényt inokuláltunk vonalanként a 3.1.4.2. pontban leírt mechanikai módszerrel. Kontrollként 2-3 db nem transzformált Mindenes, Gülbaba, Kisvárdai Rózsa és Russet Burbank növényt fertőztünk minden vírussal. Bizonytalan eredmény esetén a növények számát 8-10-re növeltük. A vírus kimutatását a 3.2.2.2. és 3.2.2.3. pontok szerint végeztük.

3.3. Táptalajok, antibiotikumok

A táptalajok minden komponense a Duchefa Biochemie B.V. terméke az agar kivételével (Oxoid). Az antibiotikumok injekció formájában, gyógyszertárból származnak.

AB minimál, 1000 ml:

KH_2PO_4	3 g
NaH_2PO_4	1 g
NH_4Cl	1 g
$MgSO_4x7H_2O$	0,3 g
KCl	0,15 g
$CaCl_2x2H_2O$	0,01 g
Glükóz	10 g
NaFe EDTA	36,7 mg
pH 7,2	

YEB, 1000 ml:

Bacto Yeast Extract	10 g
Beef Extract	5 g
Kazein hidrolizátum	5 g
Szaharóz	5 g
Agar	15 g
pH 7,2	

MS-makro 10×, 1000 ml:

NH_4NO_3	16,5 g
KNO_3	19 g
$CaCl2×2H_2O$	4,4 g
$MgSO_4×7H_2O$	3,7 g
KH_2PO_4	1,7 g

MS-mikro 1000×, 1000 ml:

H_3BO_3	6,2 g
$MnSO_4×H_2O(×4H_2O)$	15,6 g (20,54 g)
$ZnSO_4×7H_2O$	8,6 g
$NaMoO_4×2H_2O$	250 mg
$CuSO_4×5H_2O$	25 mg
$CoCl×6H_2O$	25 mg

MS (Murashige és Skoog, 1962 alapján módosítva[a]), 1000 ml:

MS makro 10x	100 ml
MS mikro 1000x	1 ml
KI	0,83 mg
NaFe EDTA	36,7 mg
Mio-Inozitol	100 mg
Thiamin-HCl	0,1 mg
Pyridoxin-HCl	0,5 mg
Nikotinsav	0,5 mg
Glicin	2 mg
Szaharóz	20 g[a]
pH 5,8	
Agar	6,5 g

MS minimál:

MS táptalaj vitaminok nélkül.

MSB5:

MS táptalaj makro-és mikroelemei a Gamborg-féle (Gamborg és mtsi, 1976) B5 vitamin összeállítással.

MS1/2vit:

MS táptalaj fele töménységű vitaminokkal.

Gumóindukciós:

MS közeg makro-és mikroelemei fél töménységben, vitaminok teljes koncentrációban, 80 g szaharózzal.

Antibiotikumok végkoncentrációi:

Ampicillin	100 mg/l
Kanamycin (*Agrobacterium*)	50 mg/l
Kanamycin (*E. coli*)	25 mg/l
Cefotaxim	300 mg/l vagy 500 mg/l

4. EREDMÉNYEK

A fejezet két fő részből áll. Az első részben transzgénikus burgonyavonalak előállítását, majd azok molekuláris és rezisztencia vizsgálatának eredményeit foglaljuk össze, míg a második részben a burgonya Y vírus fertőzőképes hibrid klónjainak előállítását és ezek jellemzését ismertetjük.

4.1. Transzgénikus burgonyavonalak előállítása

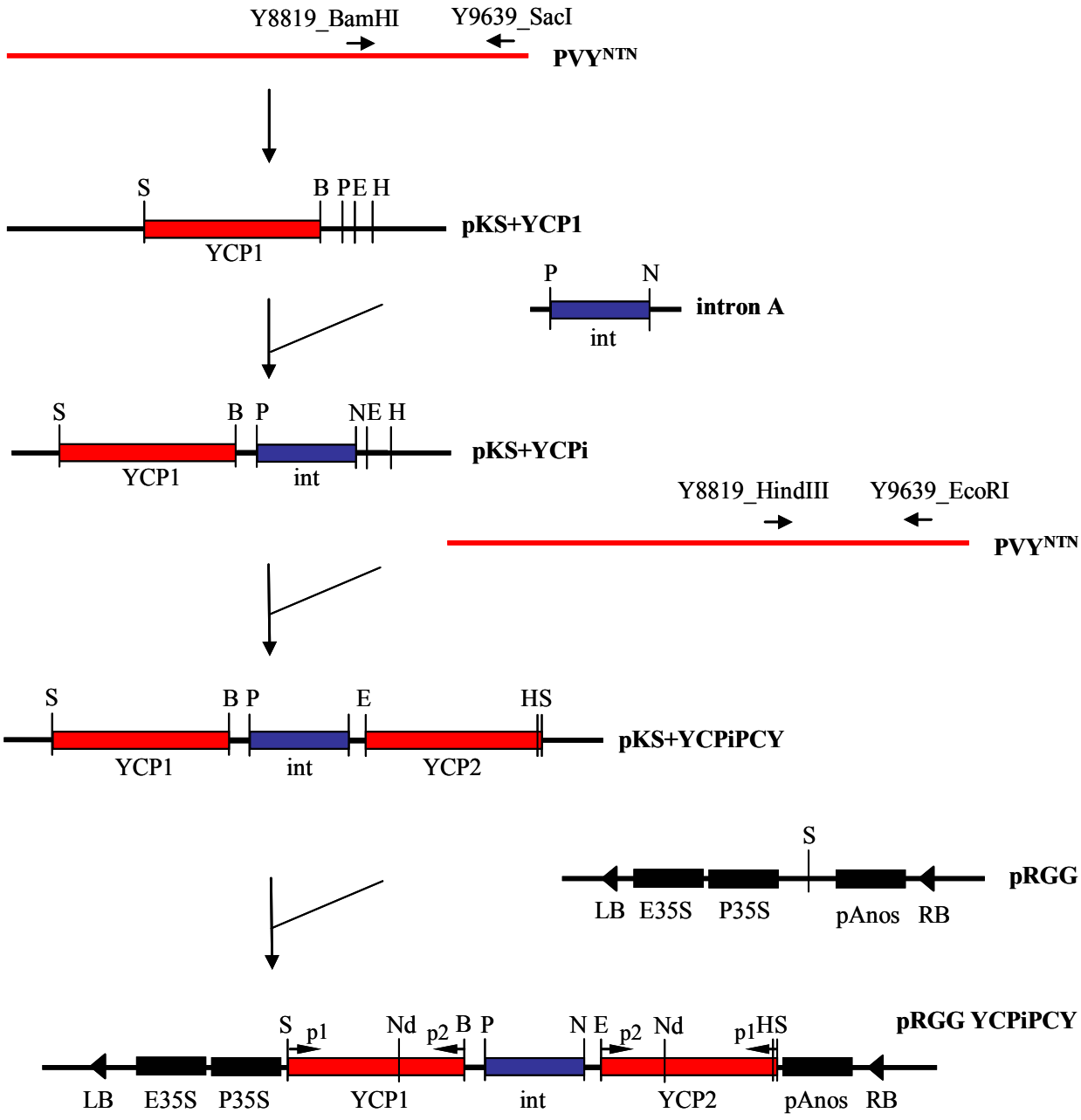
4.1.1. Vírusrezisztenciát kialakító plazmidkonstrukció készítése

A konstrukció készítéséhez a pRGGneo bináris vektorból (Mihálka és mtsi, 2000) indultunk ki. Ebből eltávolítottuk a *gus* és az *nptII* géneket SacI, illetve HindIII+BamHI restrikciós emésztéssel, így a létrejött pRGG plazmid a hasznos gén befogadására és marker-mentes transzformációra alkalmassá vált. A *gus* gén helyére a PVY-H 820 nt hosszúságú szakaszát építettük be intronnal elválasztott fordított ismétlődés (inverted repeat) formájában. A beépített cDNS fragment a PVY-H CP génjének utolsó 554 nukleotidját, és a 3' nem kódoló régió (3'NTR) első 266 nukleotidját tartalmazza. Mivel a komplementer vírusszekvenciák jelenléte következtében hajtű struktúra alakul ki, ezt a típusú génkontrukciót hajtű kontrukciónak nevezzük.

A hajtű konstrukció elkészítésének lépései a következők voltak (4.1 ábra):

1. A PVY-H 8819. és 9639. nukleotidja közti régió reverz transzkripciót követő amplifikálása a Y8819_BamHI és Y9639_SacI primerekkel (3.1 táblázat).
2. A PCR termék (YCP1 fragment) SacI és BamHI restrikciós emésztést követő beépítése ugyanígy emésztett pBluescript II KS(+) (továbbiakban pKS+) vektorba, a keletkezett klón: pKS+YCP1.
3. A burgonya intront tartalmazó vektorból („intron A"; Johansen, 1996) az intron kiemelése PstI és NsiI hasítással.
4. pKS+YCP1/PstI plazmid ligálása a PstI és NsiI restrikciós végű intronnal, a keletkezett klón: pKS+YCPi.
5. Az YCP2 fragment amplifikálása a Y8819_HindIII és Y9639_EcoRI primerekkel (3.1 táblázat).
6. Az emésztett PCR termék (YCP2/EcoRI+HindIII) ligálása az YCPi/EcoRI+HindIII plazmiddal, a keletkezett klón: pKS+YCPiPCY

7. Az YCPiPCY kazetta kiemelése pKS+-ból SacI hasítással, ligálás az ugyanígy emésztett, a *gus* és *nptII* géneket már nem tartalmazó pRGG vektorral. A kész plazmid: pRGG YCPiPCY (4.1 ábra).

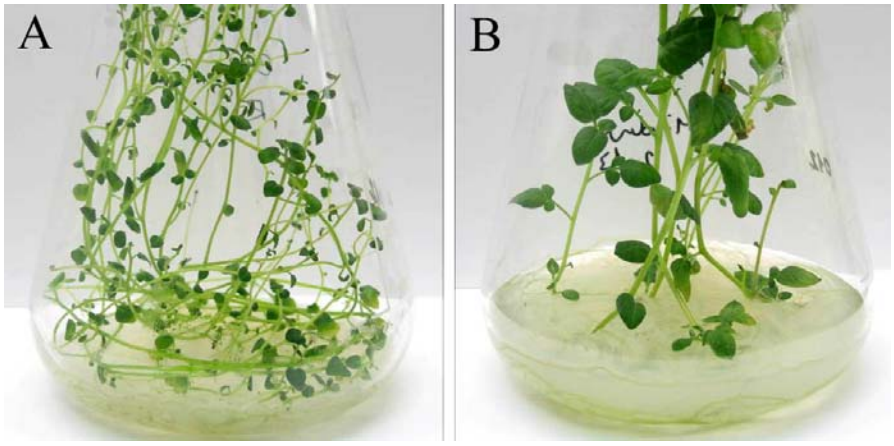


4.1 ábra. A pRGG-YCPiPCY bináris vektor klónozási lépéseinek sematikus ábrázolása.
LB, bal oldali határszekvencia (left border); *E35S*, CaMV 35S enhanszer; *P35S*, CaMV 35S promóter; *YCP1*, PVY részleges köpenyfehérje gén szensz orientációban; *int*, 188 bp-os burgonya intron (‘intron A’, Johansen 1996); *YCP2*, PVY részleges köpenyfehérje gén antiszensz orientációban; *pAnos*, nopalin szintáz terminátor; *RB*, jobb oldali határszekvencia (right border); *B*, BamHI; *E*, EcoRI; *H*, HindIII; *N*, NsiI; *Nd*, NdeI; *P*, PstI; *S*, SacI restrikciós hasítóhelyek; *p1, p2*, a transzgén kimutatáshoz használt tesztelő primerek.

A pRGG YCPiPCY-t a GV3170 agrobaktérium törzsbe transzformáltuk. Az így létrehozott törzset a továbbiakban GV3170YCP-nek nevezzük.

4.1.2. Növényi transzformáció és regeneráció

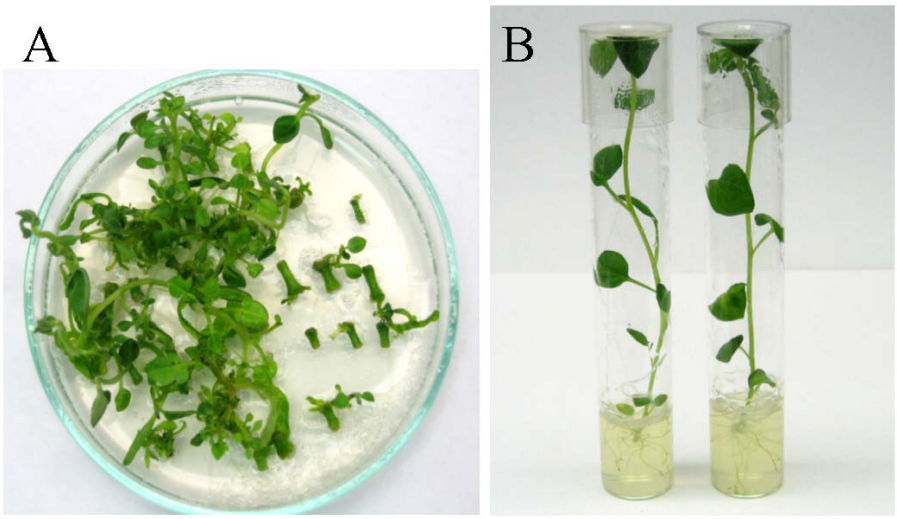
Öt burgonya fajtát transzformáltunk a GV3170YCP agrobaktérium-bináris vektor konstrukcióval. A Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Russet Burbank és Somogyi Kifli fajták esetében két független transzformációs kísérletben használtunk levelet explantként, míg a Gülbabánál három kísérletet végeztünk levéllel. Internódiumot Mindenesnél és Kisvárdai Rózsánál két kísérletben, Gülbabánál három, Russet Burbanknél négy, míg Somogyi kiflinél öt kísérletben transzformáltunk. A regenerációt az explant szövetének állapota – amely a nevelési körülményektől és a szövet korától is függ – nagymértékben befolyásolja. A transzformációra alkalmatlan, illetve alkalmas kiindulási növényanyag közötti, szemmel is jól látható különbséget a 4.2 ábra szemlélteti**.**



4.2 ábra. Transzformációra alkalmatlan (A) és alkalmas (B) explantot szolgáltató 12, illetve 3 hetes kiindulási növényanyag.

4.1.2.1. Regenerációs hatékonyság az egyes fajtáknál

A transzformációt követő regeneráció során minden fajtára általánosan érvényes volt, hogy az első, 1-1,5 cm-es regenerált hajtásokat a transzformációtól számított 4.-5. héten választottuk le az explantokról, majd ezt követően még 3-5 alkalommal történt hajtásszedés kb. egyhetes időközönként. A shooter törzs által hormonmentes táptalajon indukált regeneráció jellemző fázisait a 4.3 ábra mutatja be.



4.3 ábra. A Mindenes fajta regenerációja a GV3170 agrobaktérium törzzsel történt fertőzést követően. A, Intenzív regeneráció internódiumokon 5 héttel a fertőzés után; B, az explantról 2 hete leválasztott normál fenotípusú hajtás gyökereztető táptalajon.

A Mindenes fajtával végzett két független transzformációs kísérletben 200 explantot fertőzve összesen 802 hajtás regenerált. Megállapítottuk, hogy a regeneráció szempontjából az internódium 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, amelyekben összesen 320 explanton 426 hajtás regenerálódott. Ebben az esetben is jobb regenerációs rátát adott az internódium (1,6 hajtás/explant), mint a levél (0,8 hajtás/explant).

A Russet Burbank és Somogyi kifli fajtáknál két transzformációs kísérlet után már csak internódiumokat transzformáltunk, mivel levél esetén ezeknél a fajtáknál is gyenge regenerációs rátát kaptunk. A Russet Burbankkal elvégzett négy transzformációs kísérlet eredményeként 458 explantról 525, vagyis átlagosan 1,2 hajtás képződött internódiumonként, míg Somogyi kifli esetében öt kísérletben 1377 explantról 703 regeneránst kaptunk (0,5 hajtás/explant). Az öt burgonya fajtával végzett kísérletek regenerációs eredményeit a 4.1 táblázat foglalja össze.

4.1 táblázat A GV3170YCP baktérium törzset alkalmazó transzformációs kísérletek regenerációs hatékonyságának eredményei az öt burgonyafajta esetében.

Fajta	Független kísérletek száma	Explant típusa	Explantok száma	Független regeneránsok száma	Regeneránsok átlagos száma/explant
Mindenes	2	Levél	80	119	1.5
	2	Internódium	120	683	5.7
Kisvárdai Rózsa	2	Levél	80	117	1.5
	2	Internódium	120	473	4.0
Gülbaba	3	Levél	120	100	0.8
	3	Internódium	200	326	1.6
Russet Burbank	2	Levél	80	9	0.1
	4	Internódium	458	525	1.2
Somogyi kifli	2	Levél	230	5	0.02
	5	Internódium	1377	703	0.5

4.1.2.2. 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 hajtások YCP PCR vizsgálatainak eredményei és az egyes vonalak fenotípus adatainak összevetése után megállapítottuk, hogy a pozitív reakciót adott vonalak (YCP^+) közül a legtöbbnél 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 (4.3 ábra).

Az *ipt* génre annak hajtásindukáló tulajdonsága miatt volt szükség a transzformációs rendszerben, a regeneráció során azonban a fenotípusra gyakorolt hatása is megnyilvánult. Az *ipt* gént hordozó vonalakban nagyobb eséllyel volt várható az YCP transzgén beépülése is,

ezért a vizsgálatok egy részénél a mintaszedés során ezeket a vonalakat előnyben részesítettük (szelektált mintaszedés).

4.3 ábra. A GV3170YCP konstrukcióval végzett burgonya tanszformáció során regenerált főbb hajtástípusok. A) Teljesen normális, gyökeres *in vitro* hajtás, B) abnormális, átmeneti fenotípus, redukált apikális dominanciával és gyökeresedési képességgel, C) extrém shooty fenotípus (ESP). Az abnormális fenotípust a B) és C) esetben az *ipt* gén megnyilvánulása okozza.

A Mindenes, a Kisvárdai Rózsa és a Gülbaba esetében szelektált és random mintaszedési módot is alkalmaztunk. A Russet Burbank és Somogyi kifli fajtáknál a mintaszedés random módon történt, utóbbi fajtánál az összes regenerált hajtást megvizsgáltuk, mivel itt az első PCR eredmények alapján alacsony volt a transzformációs hatékonyság. 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 Mindenes és Kisvárdai Rózsa fajtáknál kiemelkedően magas – 53, illetve 50 % –, a Gülbabánál pedig 24 % volt szelektált mintaszedés esetén. Random mintaszedés után 4-28 % közötti transzformációs rátát állapítottunk meg – a legmagasabbat a Kisvárdai Rózsa, a legalacsonyabbat a Somogyi kifli esetében (4.2 táblázat).

Az YCP^+ vonalak közül összesen 84, *in vitro* fenntartott, független vonal részletes vizsgálatát végeztük el. A vírus köpenyfehérje gén ismételt vizsgálatán kívül az *ipt* génre és az agrobaktérium esetleges jelenlétére (kromoszomális *cheA* gén) is teszteltük a növényeket. 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*$^-$). Ennek a vizsgálatnak a fajtákra lebontott eredményeit a 4.3 táblázat mutatja be. Agrobaktériumot egyik vonalból sem tudtunk kimutatni. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a vizsgált transzgénikus vonalak átlagosan 30 %-a (21 vonal) csak a hasznos gént hordozta, a bakteriális eredetű *ipt* gént nem.

4.2 táblázat. Transzformációs hatékonyság az egyes burgonyafajták esetében a mintaszedés módjának figyelembe vételével.

Burgonyafajta	YCP$^+$ vonalak száma / tesztelt vonalak száma	
	Szelektált mintaszedés	Random mintaszedés
Mindenes	126 / 240 (53 %)	4 / 20 (20 %)
Kisvárdai Rózsa	36 / 71 (50 %)	22 / 80 (28 %)
Gülbaba	4 / 17 (24 %)	16 / 137 (12 %)
Russet Burbank	Nem vizsgált	20 / 111 (18 %)
Somogyi kifli	Nem vizsgált	28 / 642 (4 %)
Összesen	*166 / 328*	*90 / 990*

4.3 táblázat. Öt burgonyafajtából összesen 69 YCP$^+$ vonal *ipt* génre vonatkozó PCR vizsgálati eredményei. A táblázatban az *ipt* génre negatív, tehát marker mentes vonalak számát tüntettük fel.

Burgonyafajta	YCP$^+$ vonalak száma	*ipt*$^-$ vonalak száma	*ipt*$^-$/YCP$^+$
Mindenes	16	8	50 %
Kisvárdai Rózsa	25	5	20 %
Gülbaba	11	5	45 %
Russet Burbank	6	2	33 %
Somogyi kifli	11	1	9 %
Összesen	*69*	*21*	*30 %*

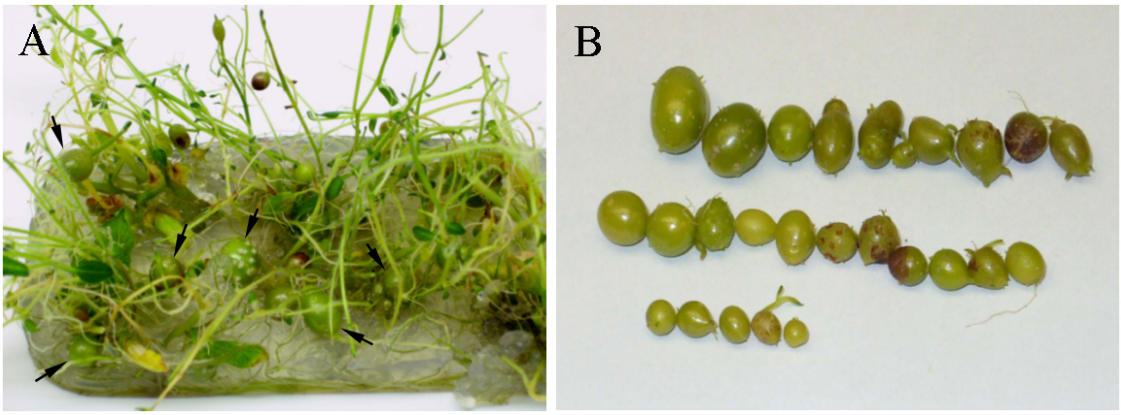
4.1.3. Transzgénikus vonalak nevelése rezisztencia teszthez

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

4.1.3.1. Minigumó indukálás

A burgonya esetében az általánosan használt szaporítóanyag a gumó vagy minigumó. Ezért megvizsgáluk, hogy az általunk alkalmazott transzformációs rendszerrel létrehozott vonalak alkalmasak-e normális minigumó képzésre, és az *ipt* gén jelenléte befolyásolja-e a gumóképzést.

A Mindenes, a Kisvárdai rózsa, a Gülbaba és a Russet Burbank fajtákból a vonalakat úgy választottuk ki, hogy mindhárom fenotípus csoport szerepeljen a kísérletben. Összesen 9 normál, 10 átmeneti és 15 extrém shooty fenotípusú transzgénikus vonalat vontunk be a kísérletekbe. A kétlépéses folyadékos gumóindukciós módszerrel egy, míg az egylépéses szilárd táptalajon történő indukcióval három kísérletet indítottunk. A gumóképződés megindulásának ideje és az indukciós módszer között nem találtunk összefüggést, az első gumók 2-4 hét múlva jelentek meg minden esetben. A képződött minigumókat számuk és méretük szerint 8-10 héttel a kísérlet kezdete után értékeltük (4.4 ábra). A gumók mérete 2 és 15 mm között változott. Megfigyeltük, hogy azokban a vonalakban, ahol az *ipt* gén fenotípusos hatása megnyilvánult, nagyobb számban képződtek az 5 mm-nél kisebb gumók. A normális fenotípusú transzgénikus vonalakban az 5 mm-nél nagyobb gumók száma volt magasabb. Az össz-gumószám a három fenotípus csoport (normál, átmeneti és ESP) mindegyikében nagy szórást mutatott: 7-39, 12-45, illetve 11-49 gumót számoltunk meg dobozonként. A nem transzgénikus kontrollon (Kisvárdai Rózsa) 23 és 26 db minigumó képződött a folyadékos, illetve a szilárd táptalajon történő indukcióval, és az 5 mm feletti gumók száma jóval nagyobb volt, mint az 5 mm alattiaké.



4.4 ábra. *A*, Nem transzgénikus Mindenes fajta minigumó indukciója szilárd táptalajon 8 héttel a kísérlet indítása után. A képen Veg-boxból kiemelt anyag látható. A nyilak gumókat mutatnak. *B*, Leszüretelt minigumók (egy dobozból).

A gumók csírázása

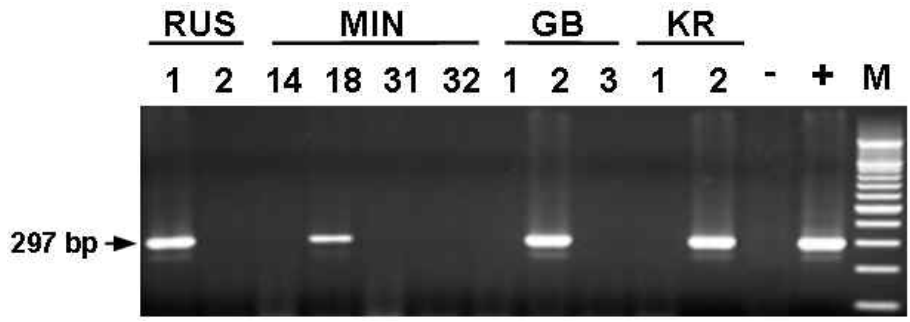
A leszüretelt minigumók pihentetése ill. hidegkezelése után a négy fajtából összesen 30, mindhárom fenotípust mutató vonal gumóit ültettük ki növényházba. 37-54 % csírázási arányt kaptunk, amely időben több hétig is elhúzódott. A gumók kihajtásának egyenletességére az anyanövény fenotípusa, a gumóméret és a hidegkezelés nem volt jelentős hatással. A legfontosabb tényező azok érettségi állapota volt, megfelelően parásodott bőrszövet esetén a csírázás gyorsan, egy hét alatt megindult. Ellenkező esetben 10 hét elteltével is találtunk élő, ám ki nem csírázott gumókat.

4.1.3.2. Palántanevelés

A minigumókból történő hajtatás nagyon egyenlőtlen kelést eredményezett, ezért a később vizsgálatra került Somogyi kifli vonalak fertőzéséhez szükséges növényeket palántázással állítottuk elő. Az *in vitro* növények gyökeresedés után a tőzegpogácsában hamar megerősödtek és kiültethetők voltak. Ezzel a módszerrel a kiültetési veszteség elhanyagolható volt, és a növényeket azonos időben lehetett fertőzni az egyenletes növekedés miatt.

4.1.4. Rezisztencia teszt

Az YCP, *ipt* és *cheA* génekre PCR–rel vizsgált vonalak közül negyvenkettőt vontunk be a rezisztencia vizsgálatokba, amelyek közül 23 hordozta, 19 pedig nem hordozta az *ipt* gént. A PVY-H az általunk vizsgált burgonyafajták hajtásain nem okozott jól látható tüneteket, ezért a burgonyanövények inokulálása után minden esetben RT-PCR-rel végeztük a vírus kimutatását. Vizuális kiértékelést csak a visszafertőzött dohánynövényeknél alkalmaztunk.
Rezisztensnek nyilvánítottuk azokat a vonalakat, amelyekről a dohányokat visszainokulálva azok szisztemikus levelein nem jelentek meg tünetek (érkivilágosodás, majd nekrózis), és a HC-Pro régióra specifikus primerpárral a PVY nem volt kimutatható (4.5 ábra). 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 (4.4 táblázat). A rezisztencia vizsgálatok után a növényeket tovább neveltük a gumók kifejlődéséig. A gumók felszedésekor azokon sem a rezisztens, sem a fogékonynak bizonyult vonalak esetében nem voltak láthatóak a PVY-H-ra jellemző vírustünetek.



4.5 ábra. Néhány PVY-nal inokulált, YCP+ burgonya vonal RT-PCR analízise 14 nappal az inokulálás után. *RUS*, Russet Burbank; *MIN*, Mindenes; *GB*, Gülbaba; *KR*, Kisvárdai Rózsa; (–), nem inokulált burgonya (Kisvárdai Rózsa); (+), PVY^{NTN}-nel fertőzött *N. tabacum* cv. Xanthi; *M*, O'Range Ruler 100-bp DNS marker. A 297-bp vírus-specifikus fragment (nyíl) jelenléte fogékony vonalakat jelent, annak hiánya pedig rezisztens vonalakra utal.

4.4 táblázat. Negyvenkét YCP^+ vonal rezisztencia tesztjének eredményei fajtákra lebontva, valamint a marker mentes (ipt^-) rezisztens vonalak aránya.

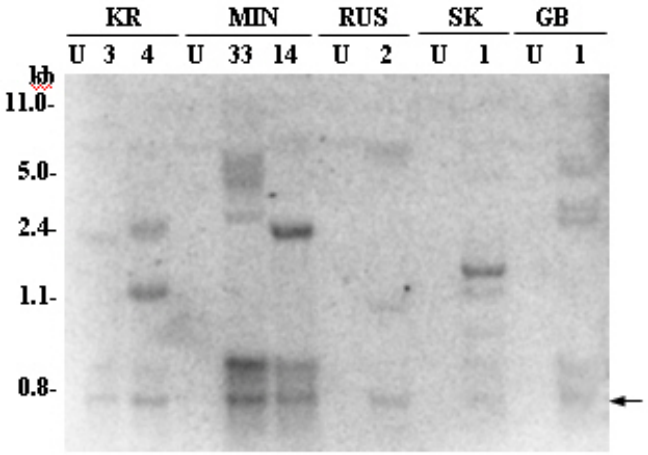
Burgonyafajta	YCP^+ vonalak száma	PVY^R vonalak száma (PVY^R/YCP^+)	PVY^R ipt^- vonalak száma (PVY^R ipt^-/YCP^+)
Mindenes	12	5	3
Kisvárdai Rózsa	7	2	2
Gülbaba	7	5	3
Russet Burbank	5	4	2
Somogyi kifli	11	9	1
Összesen	*42*	*25 (60 %)*	*11 (26 %)*

PVY^R: PVY rezisztens

4.1.5. 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 (4.1 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 (4.1 ábra), amelyet mind a hét vonal esetében detektáltunk (4.6 ábra). A genomba történt integráció esetén azt vártuk, hogy a bloton nem jelennek meg a plazmidra jellemző fragmentek. A pRGG YCPiPCY plazmid NdeI restrikciós enzimmel történő emésztésével egy ~10, egy ~5, és egy 0,66 kb méretű fragment keletkezik. A bloton látható többi – nem 660 bp méretű – fragment láthatóan nem a plazmidról származott, hiszen azok mérete más, mint a plazmid kontroll NdeI fragmentjei. Ez bizonyítja az YCPiPCY konstrukció genomba történt integrációját. A kapott nagyszámú fragment többszörös T-DNS integráció eredménye. Egy kópia beépülése három, két kópia négy vagy öt, míg három kópia integrációja öt-hét fragmentet eredményez a beépülés módjától függően. A 4.6 ábrán látható kép alapján a KR3 és RUS2 vonalakban kettő, míg a KR4, MIN14, MIN33 és GB1 vonalak genomjában több kópia van jelen.



4.6 ábra. Hét kiválasztott PCR YCP$^+$, rezisztens burgonya vonal Southern analízisének eredménye. A p1 és p2 primerek (4.1 ábra) által generált próbát az NdeI enzimmel emésztett növényi genomi DNS-hez hibridizáltattuk. A várt 660 bp-os fragment (kis nyíl) mindegyik vonalban jelen van. *U*, nem transzformált burgonya kontroll; *KR*, Kisvárdai Rózsa; *MIN*, Mindenes; *RUS*, Russet Burbank; *SK*, Somogyi Kifli; *GB*, Gülbaba. KR3 = KR4.2.31, KR4 = KR5.1.5, MIN33 = MIN5.1.10, MIN14 = MIN4.2.50, RUS2 = RUS4.1.1, SK1 = SK12.3.20, GB1 = GB5.3.26 rezisztens burgonya vonalak.

4.2. Hibrid PVY klónok előállítása és vizsgálata

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

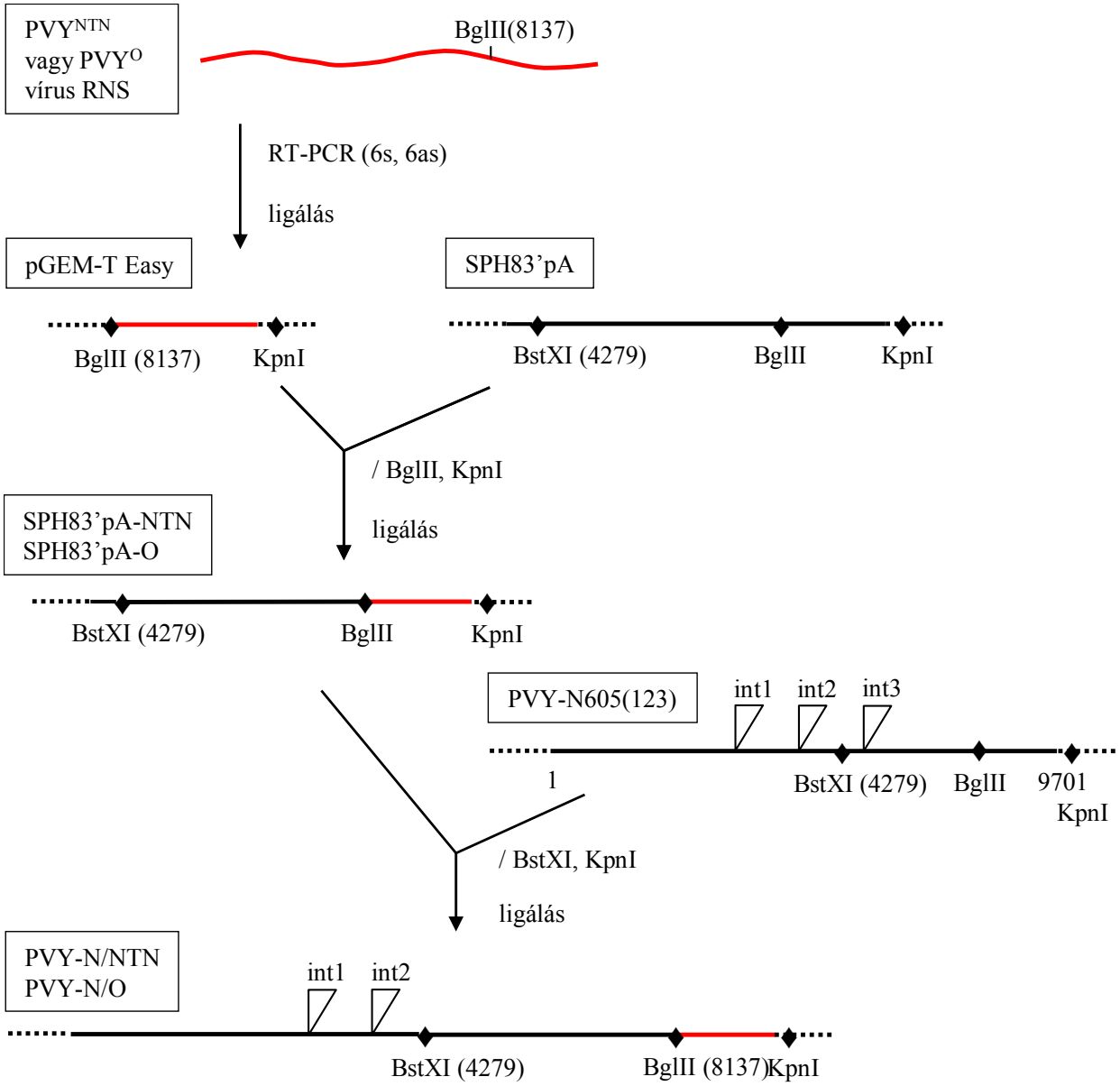
4.2.1. Hibrid PVY cDNS klónok előállítása

Első lépésként a PVY^{NTN} és PVY^{O} vírustörzsek RNS genomjának 3' végét a 6s/6as primerpárral (3.2 táblázat) reverz transzkripciót követő PCR-rel felszaporítottuk, majd a terméket pGEM-T 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 (Jakab és mtsi, 1997). A SPH83'pA plazmidban a PVY^{N} BglII és KpnI hasítóhelyek közötti szakaszát helyettesítettük a másik két törzs megfelelő szakaszával, ami az SPH83'pA-NTN és SPH83'pA-O szubklónokat eredményezte. Végül a szubklónok BstXI és KpnI hasítóhelyek által határolt fragmentjeit az ugyanezekkel a restrikciós enzimekkel emésztett, három intront tartalmazó PVY-N605(123) teljes klón megfelelő részébe illesztettük (4.7 ábra). Ez utóbbi lépéssel 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 NIb kódoló régiójának utolsó 436 nukleotidját, a teljes köpenyfehérje kódoló régiót és a 3'NTR-t tartalmazták PVY^{N} háttérben (4.8 ábra).

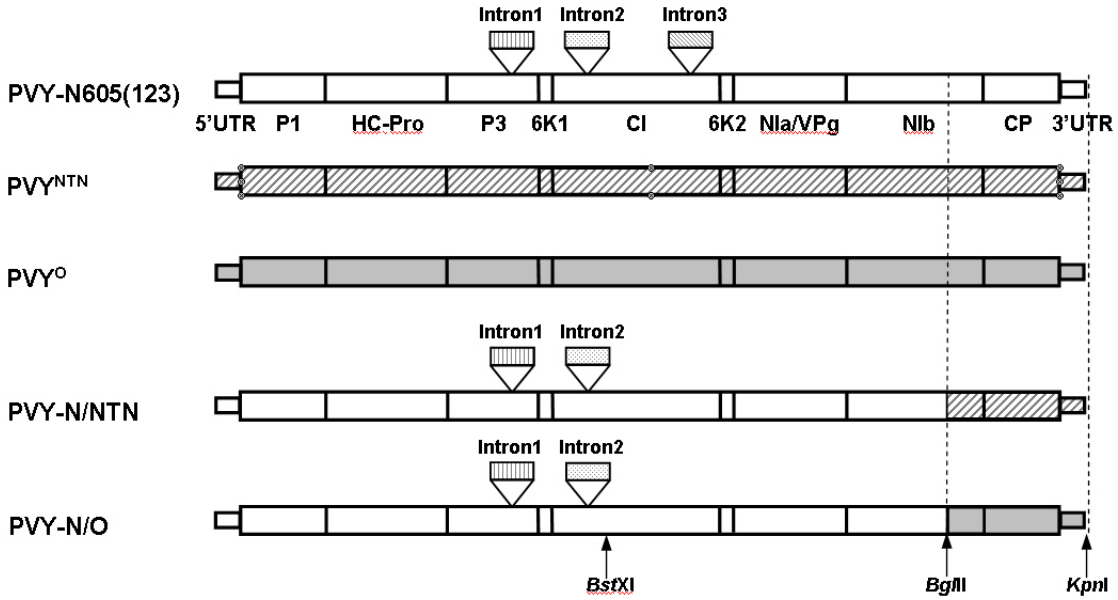
4.2.2. A fertőzőképesség vizsgálata

A hibrid cDNS klónok elkészítése után mindenekelőtt azok fertőzőképességének vizsgálatára volt szükség, amihez *Nicotiana benthamiana* növényeket használtunk. A PVY-N/NTN hibriddel öt, a PVY-N/O hibriddel három biolisztikus (génpuska) inokulációs kísérletet végeztünk. Minden esetben párhuzamosan a PVY-N605(123) cDNS klónnal, mint kontrollal is inokuláltunk növényeket. Az inokulált növényekben a vírus szisztemizálódását két héttel a fertőzés után ELISA módszerrel vizsgáltuk. Az ELISA tesztek során a PVY-N605(123)-mal 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. A fertőzés plazmidról történt kialakulása után a vírusok mechanikai továbbvitelével azonban már 100 %-os szisztemizálódást tapasztaltunk.



4.7 ábra. A PVY-N/NTN és PVY-N/O hibrid vírusok előállításának sematikus klónozási lépései. A magyarázat a szövegben található. Az ábrán a konstrukciók nem méretarányosak. A restrikciós hasítóhelyek (BglII, BstXI, KpnI) pozíciói a PVY-N605 genomi szekvenciára (GeneBank acc. nr. X97895) vonatkoztatottak. A szaggatott vonal vektor szekvenciát jelöl.



4.8 ábra. A PVY-N605(123) teljes klón, a PVY^{NTN}, PVY^{O} szülői törzsek, valamint az előállított hibrid PVY-N/NTN és PVY-N/O genomjának sematikus ábrázolása. Az azonos szekvenciájú genomszakaszok azonos színnel jelöltek. Minden esetben csak a vírusgenomot ábrázoltuk, a vektor szekvenciát nem tüntettük fel. A BstXI (nt 4279) és BglII (nt 8137) restrikciós helyek pozíciói a PVY-N605 genomra (GeneBank acc. nr. X97895) vonatkoznak. A KpnI hely közvetlenül a poliadenilációs szignál után következik a vektor szekvenciában.

4.2.3. Szekvenciavizsgálatok

Először a hibrid PVY klónok készítéséhez használt PVY^{NTN} és PVY^{O} pGEM-T Easy vektorba klónozott cDNS fragmentek szekvencia analízisét végeztük el.

A DSMZ adatai alapján a felhasznált PVY^{NTN} egy Horváth J. nevével jelzett magyar izolátum volt. Közelebbi információ nem állt rendelkezésünkre, ezért BLAST program (Altschul és mtsi, 1990) segítségével megkerestük, hogy az izolátum 3' végi 1568 nukleotid hosszú genomszakaszának nukleinsav sorrendje mely közölt szekvenciával mutatja a legmagasabb homológiát. A találatok alapján ezen izolátum szekvenciája a Thole Vera kandidátusi értekezésében közölt szekvenciához (Thole és mtsi, 1993, GenBank accession nr. M95491) állt legközelebb 99 % homológiával – a kicserélt régióban 9 nukleotid különbséget találtunk. A két szekvencia összehasonlítása az 1. számú mellékletben látható.

A felhasznált PVY^{O} izolátum Németországból származott, és ebben az esetben sem volt pontos információnk az izolátum nukleinsav sorrendjéről. Az ebből az izolátumból általunk meghatározott 1568 nukleinsavhoz szintén BLAST program segítségével kerestük a leghasonlóbb szekvenciákat. Az eredmények alátámasztották ezen izolátum PVY^{O} törzshöz

való sorolását, az első tíz találatban PVY^O vagy a genom 3' végén PVY^O-szekvenciát hordozó természetes rekombináns (Wilga) izolátumok szerepeltek. Az első találatként kapott SYR-Wi-11 izolátummal való szekvenciaillesztést – amely 99 %-os homológiát mutat a két szekvencia között – a 2. sz melléklet mutatja be.

Számos passzálás után – kb. másfél-két év elteltével – a hibrid vírusok CP és 3'NTR 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 aminosavcserét. A PVY-N/O kiméra ugyanezen genomi régiójában nem történt nukleotidcsere.

4.2.4. Gazdanövény teszt

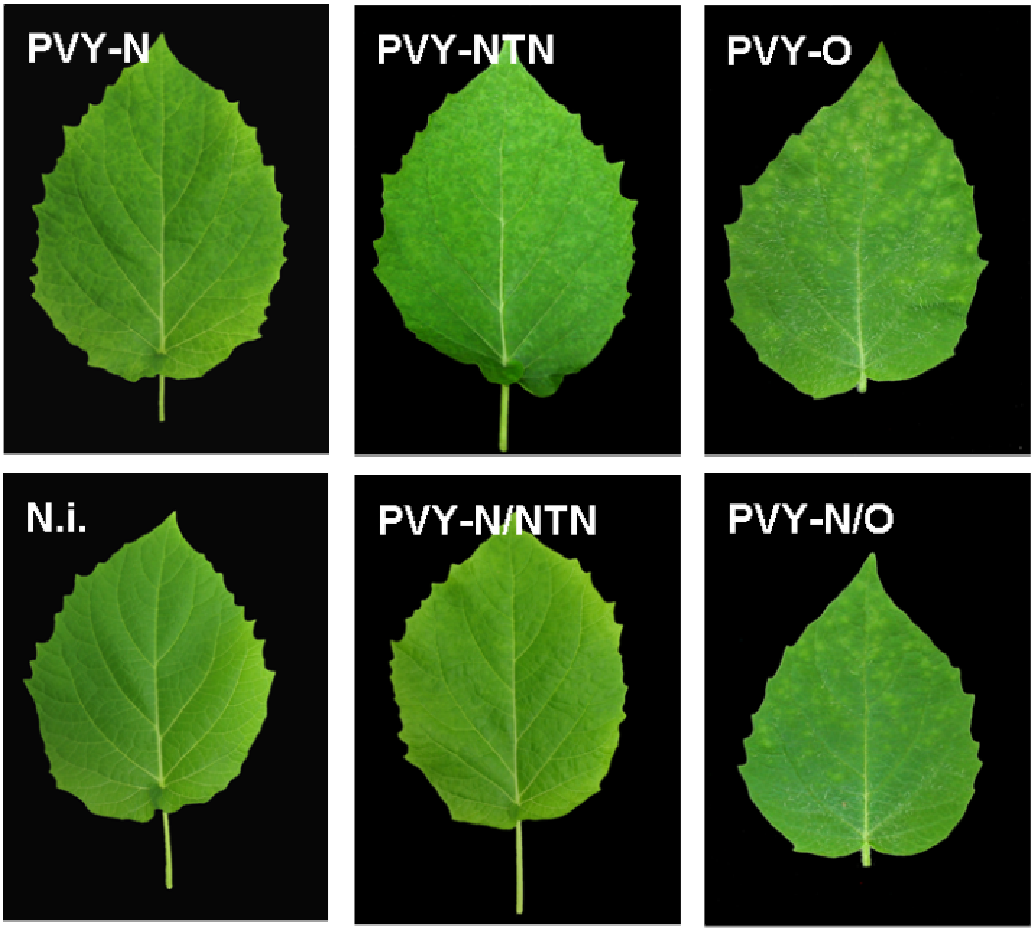
A különböző PVY törzsek és mesterséges hibridek tünetkialakítását hat, a *Solanaceae* családba tartozó gazdanövény fajon vizsgáltuk meg. Megállapítottuk, hogy mindegyik vírus szisztemikusan fertőzte az összes vizsgált növényfajt.

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 nekrózist okoztak, ami törpüléssel is együtt járt. Kivétel itt a PVY^O volt, amely enyhe mozaikosodást idézett elő. A *N. glutinosa* tesztnövények 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 fertőzésekor jelentek meg foltos-mozaikos tünetek. A *P. pubescens* esetében egy kicsit árnyaltabb képet kaptunk: a PVY^N, PVY^{NTN} és PVY-N/NTN egyértelmű mozaikosságot okozott, 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 egyértelműen mozaikos lett, míg PVY^N-nel vagy PVY-N/NTN-nel fertőzve általában alig látható, de hasonló tüneteket produkált. A két, O szekvenciát hordozó vírus viszont 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 szimptómákat. (4.5 táblázat). Ezzel szemben a *P. floridana* fertőzésekor két vírus (PVY^O és PVY-N/O) okozott egymáshoz hasonló, de a másik háromhoz képest különböző tüneteket (4.9 ábra).

4.5 táblázat A szülői PVY törzsekkel és hibrid vírusokkal végzett gazdanövény teszt során az egyes növényfajokon megfigyelt tünettípusok

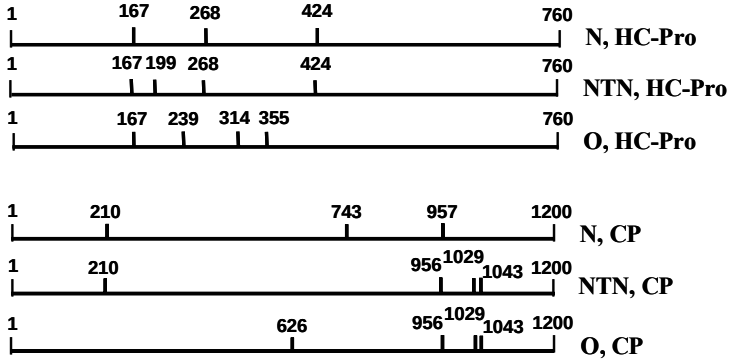
Gazdanövény	PVY^{N}	PVY^{NTN}	PVY^{O}	PVY-N/NTN	PVY-N/O
Nicotiana benthamiana	LD*	LD, S	LD	LD	LD
Nicotiana tabacum cv. Xanthi	LN, S	LN, S	ns vagy mM	LN, S	LN, S
Nicotiana glutinosa	sR vagy ns	M	sR vagy ns	sR vagy ns	sR vagy ns
Solanum tuberosum cv. Russet Burbank	ns	ns	M, Mo	ns	ns
Physalis pubescens	M	M, sS	mM	M	mM
Physalis floridana	mM vagy ns	M	CH, majd LN	mM vagy ns	CH, majd LN

*CH: klorotikus foltok (chlorotic spots); LD: levél torzulás (leaf distortion); LN: levél nekrózis (leaf necrosis); M: mozaik; mM: enyhe mozaik (mild mosaic); Mo: foltosodás (mottling); ns: nincs tünet (no symptoms); S: törpülés (stunting); sR: enyhe ráncosodás (slight rugosity); sS: enyhe törpülés (slight stunting).



4.9 ábra. A három vad és két hibrid PVY törzs által előidézett tünetek *Physalis floridana* fiatal levelein kb. két héttel az inokulálás után. Ni, nem inokulált, egészséges kontroll növény
4.2.5. A vírusok megkülönböztetése egyes genomszakaszok RFLP mintázata alapján

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, ami lehetővé tette a három szülői vírus megkülönböztetését, valamint a szülői és a hibrid vírusok elkülönítését (4.10 ábra).

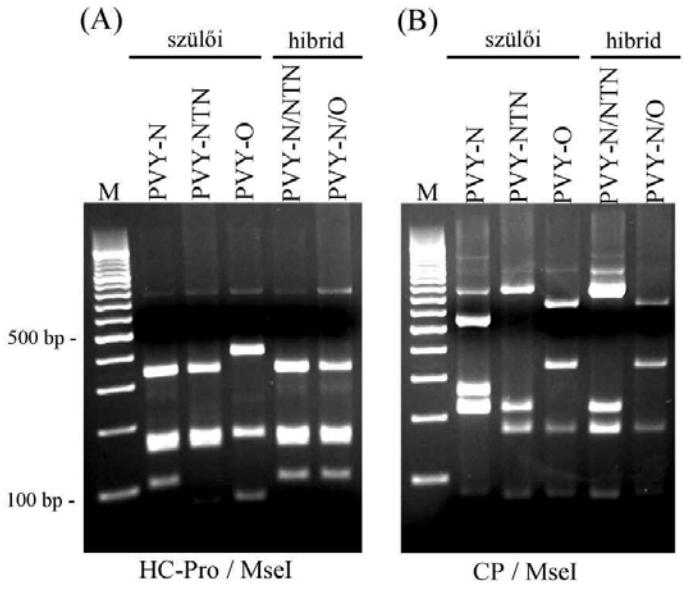


4.10 ábra. MseI restrikciós hasítóhelyek helyzete a HCPro1082_for/HCPro1841_rev, illetve a CP8503_for/CP9701_rev primerpárokkal (3.2 táblázat) amplifikált 760, illetve 1200 bp hosszú PCR termékeken (az ábrán HC-Pro, illetve CP névvel jelölve). *N*, PVY^{N} szekvencia; *NTN*, PVY^{NTN} szekvencia; *O*, PVY^{O} szekvencia.

A HC-Pro régió 760 bp-nyi szakaszának amplifikálása és a termék emésztése után a három szülői törzs mintázata különbözött egymástól (PVY^{N}: 101, 156, 167 és 336 bp; PVY^{NTN}: 22, 69, 156, 167, 336 bp; PVY^{O}: 41, 72, 75, 167, 405 bp), míg a két hibrid restrikciós mintázata azonos a PVY^{N} törzsével.

A CP8503_for és CP9701_rev primerekkel amplifikált 1200 bp hosszú CP+3'NTR fragment MseI enzimes hasítása után az öt vírus esetén háromféle eredményt kaptunk: a PVY^{NTN} és PVY-N/NTN ugyanazokat a 14, 73, 157, 210 és 746 bp méretű fragmenteket adta, a PVY^{O} és PVY-N/O-t 14, 73, 157, 330 és 626 bp-os fragmentekre hasította, míg a PVY^{N} által fertőzött növény esetén 210, 214, 243 és 533 bp méretű termékeket kaptunk (4.11 ábra).

A 4.8 ábra mutatja, hogy a HC-Pro régió szekvenciája a szülői törzsek között, míg a CP+3'NTR régióé a hibridek között tér el, ezért a két genomi régió RFLP mintázatának együttes ismeretében egyértelműen azonosítható az öt vírus (4.11 ábra). A fertőzött növények vizsgálata során minden esetben a vártnak megfelelő mintázatot kaptuk.



4.11 ábra. A szülői és hibrid vírusok azonosítása a HC-Pro és a CP+3'NTR régió restrikciós mintázata alapján 1,8 %-os agaróz gélen. A 760, illeve az 1200 bp-os amplifikált fragmenteket MseI enzimmel emésztve a vírusok egyértelműen elkülöníthetők. *M*, O'RangeRuler 100 bp DNS létra.

4.2.6. Transzformáns burgonyavonalak rezisztencia vizsgálata különböző vírustörzsekkel

Megvizsgáltuk a PVY-H szekvenciát tartalmazó hairpin konstrukció által indukált rezisztencia hatékonyságát a hibrid vírusok készítéséhez használt PVY^{N}, PVY^{NTN} és PVY^{O} szülői törzsek, és az általunk előállított rekombináns vírusok ellen. A kísérletbe bevont három transzgénikus burgonya vonal (GB4.2.31, MIN5.1.62, MIN4.2.50) a munka korábbi részében stabil rezisztenciát mutatott a PVY-H izolátum (PVY^{NTN} törzs) ellen. Ezeket a transzgénikus vonalakat a három szülői és a két rekombináns vírussal inokulálva azt az eredményt kaptuk, hogy mindegyik rezisztens volt mindegyik vírusra az RT-PCR eredmények alapján, és tünetek sem voltak megfigyelhetők a növényeken.

Négy nem transzgénikus fajtát (kontroll fajták) is inokuláltunk ugyanezzel az öt vírussal. A Kisvárdai rózsa, Gülbaba és Russet Burbank 100 %-ban, a Mindenes fajta 87 %-ban fertőződött a vad típusú vírusokkal, míg a hibrid vírusokkal inokulálva a Mindenes csak 40, ill. 50 %-ban fertőződött (PVY-N/NTN, ill. PVY-N/O), a többi burgonyafajta ezzel szemben a hibridekre is teljesen fogékony volt (4.6 táblázat).

4.6 táblázat. Három transzgénikus burgonya vonal és kontrollként négy, nem transzformált fajta növényházi fertőzési kísérletének eredményei 3 szülői és két rekombináns PVY törzzsel. A táblázat két kísérlet összesített adatait tartalmazza.

Vírustörzsek	Transzgénikus vonalak			Kontroll fajták			
	Fertőzött növények/inokulált növények						
	GB 4.2.31*	MIN 5.1.62	MIN 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

*****_GB4.2.31_, transzgénikus Gülbaba vonal, _MIN5.1.62_, _MIN4.2.50_, transzgénikus Mindenes vonalak; _MIN, KR, GB, RB_, Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba és Russet Burbank nem transzformált kontroll fajták.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. Transzgénikus burgonyavonalak előállítása

Jelen munka célja PVY rezisztens burgonya vonalak hatékony létrehozása volt környezeti szempontból biztonságos génkonstrukció felhasználásával. A transzformációs kísérleteket értékes tulajdonságokkal bíró, régi magyar fajtákkal végeztük, amelyek vírusfogékonyságuk miatt ugyan több évtizede kiszorultak a köztermesztésből, azonban egyéb tulajdonságaikkal sikerrel járulhatnak hozzá a mezőgazdaságban is fontos genetikai diverzitás növeléséhez.
A hatékony transzformáció érdekében egy ún. shooter mutáns agrobaktériumon alapuló transzformációs rendszert alkalmaztunk. A felhasznált *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pGV3170-es, mutáns Ti plazmidot hordozó törzsben az auxinszintézisben résztvevő 1, 2 és 5 onkogének Tn1 transzpozon inszerció következtében inaktiváltak (Holsters és mtsi, 1980), emiatt a transzformált növényi sejtek citokinin-auxin aránya a citokinin irányába tolódik. A plazmidon működő *ipt* gén kettős funkciót tölt be a transzformáció során: egyrészt serkenti a hajtásregenerációt azáltal, hogy a transzformált sejtekben citokinin túlsúlyt alakít ki, másrészt pozitív szelekciós markerként is szolgál. Az *ipt*-t expresszáló növények gyakran redukált apikális dominanciát mutatnak, és nem vagy nehezen gyökeresednek, ún. shooty fenotípusúak (ESP - extreme shooty phenotype) (Ebinuma és mtsi, 1997a). Mihálka és mtsi (2003) azonban egy, a GV3170-nel teljesen megegyezően viselkedő törzzsel (ShooterG) nagy hatékonysággal állítottak elő normális fenotípusú (*ipt*$^-$) dohány vonalakat. Az egyik kísérletben ez olyan hatékony volt, hogy a 12 transzgénikus hajtás egyike sem hordozta az *ipt* gént. Az eredményekből arra következtettek, hogy a shooter törzsek alkalmasak lehetnek marker mentes transzformációra. A marker mentes transzformáns növények jelentősége az utóbbi időben fokozódott, mivel a társadalmi igényeknek megfelelően kívánatos, hogy a GM növények a lehető legkevesebb idegen szekvenciát tartalmazzák.

Munkánk során a Mihálka és mtsi (2003) által paprikára kidolgozott transzformációs rendszert alkalmaztuk öt burgonyafajtára antibiotikum marker használata nélkül. A Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba, Russet Burbank és a Somogyi kifli fajták transzformációs kísérletei során összesen több mint háromezer hajtást regeneráltattunk. Az eredmények alapján az internódiumok egyértelműen jobb explantnak bizonyultak a leveleknél. Előbbiek esetében 0,5-5,7 hajtás, míg utóbbiaknál 0,02-1,5 hajtás regenerált explantonként. Az internódiumból történő regeneráció szempontjából a legjobb fajta a Mindenes volt (5,7 hajtás/explant), ezután a Kisvárdai Rózsa (4,0 hajtás/explant), a Gülbaba (1,6 hajtás/explant),

a Russet Burbank (1,2 hajtás/explant), majd a Somogyi kifli (0,5 hajtás/explant) következett. A Somogyi kifli fajtánál a transzformációhoz használt táptalaj kismértékű változtatására volt szükség. Ez a fajta regenerált ugyan, de a többihez képest igen alacsony hatékonysággal, és az első két transzformáció során transzformáns vonalat sem kaptunk. Ezért a táptalaj összetételét optimalizáltuk, az MS közeg marko- és mikroelemeit fele mennyiségű vitaminnal kiegészítve találtuk megfelelőnek a fertőzéshez. Öt kísérlet eredményeit összegezve a Somogyi kiflinél 0,5 hajtást/explant regenerációs rátát értünk el.

Missiou és mtsi (2004) különböző burgonyafajták transzformációjához több regenerációs protokollt próbáltak ki, ám átlagosan mindössze 0,3 hajtást kaptak explantonként, szemben az általunk kapott 0,5-5,7-es regenerációs rátával. Newell és mtsi (1991) PVX és PVY CP-t expresszáló Russet Burbank vonalak transzformációja során szintén alacsony regenerációs hatékonyságot értek el (0,1-0,3 hajtás/explant). Az általunk alkalmazott rendszerben levélexplantok esetén kis számú, de internódiumok esetében ennél 4-12-szer több hajtás regenerálódott.

A lehetséges transzgénikus hajtások vizsgálatához az *ipt* gén működésén alapuló vizuális szelekciót alkalmazva – vagyis az ESP vagy átmeneti fenotípust mutató hajtásokat vizsgálva – 24-53 %-os transzformációs rátát kaptunk. Vizuális előszelekciót nem alkalmazó, random mintaszedés esetén a különböző kísérletekben 4-28 %-ban kaptunk YCP^+ hajtásokat. Az ESP hajtások gyakran nem voltak felnevelhetők a gyökeresedés elmaradása miatt; előfordultak azonban olyan vonalak is, amelyek átmeneti típusból később normális fenotípusú növénnyé fejlődtek, feltehetően az *ipt* gén eliminálódása vagy csendesítése következtében. Domínguez és mtsi (2002), valamint Francis és Spiker (2005) is kimutatták, hogy a szelekció nélkül létrejött transzformánsok kb. 30 %-a géncsendesített, aminek oka lehet a heterokromatikus régióba történt integráció.

A részletes vizsgálatoknak alávetett 84 vonal ismételt YCP PCR vizsgálatát követően 82 % bizonyult pozitívnak. A transzgén elvesztését – mely jól ismert jelenség – több tényező is előidézheti, például a hosszú ideig szövettenyészetben való fenntartás (Risseeuw és mtsi, 1997), intrakromoszomális rekombináció (Fladung, 1999), vagy az invazív DNS elleni genomi védekezőmechanizmusok (Srivastava és mtsi, 1996). A 69 stabil YCP pozitív vonal közül 48 az *ipt*-t is hordozta, míg 21 vonalban a beépülés az ideális aszimmetrikus konfigurációban történt. Az eredményeket a PCR-rel vizsgált összes hajtásra extrapolálva, a negatív tényezőket (transzgén elvesztése, ipt^+ növények) figyelembe véve, az általunk alkalmazott rendszerben a marker mentes vonalak aránya a különböző fajták esetében 3-8 % között volt, kivéve a Somogyi kiflit, ahol ez az arány csak 0,2 %. Eredményeink összehasonlíthatók, vagy bizonyos fajták esetén jobbak a szupervirulens törzset alkalmazó de

Vetten és mtsi (2003) által kapott 1-5 % marker mentes transzformáns aránynál, valamint összevethető a Rommens és mtsi (2004) által kapott 6 %-os marker mentes transzformáns gyakorisággal.

A korábban létrehozott vírusrezisztens növények előállítása során a rezisztencia hatékonysága mellett a transzgén konstrukció biztonságossága nem volt fontos szempont. Sok esetben a génkonstrukció expresszálta valamelyik vírusfehérjét (Kollár és mtsi, 1993; Malnoë és mtsi, 1994; Gargouri-Bouzid és msti, 2005), vagy ha a rezisztencia RNS közvetített volt is, legtöbbször antibiotikum szelekciós markert tartalmazott (Missiou és mtsi, 2004; Bucher és mtsi, 2006).

Az általunk célul kitűzött, környezetbiztonsági szempontoknak megfelelő vírus rezisztens vonalak előállításához alapvető fontosságú volt a transzgén megfelelő kiválasztása. A kockázat csökkentését konstrukciónkban több tényező is elősegíti: (1) A vírusszekvencia nem íródik át fehérjetermékké a transzlációs start kodon hiánya miatt, így a fehérje esetleges allergén vagy toxikus hatása kizárt. (2) Nem tartalmazza a köpenyfehérje elején található DAG aminosav motívumot, amely a levéltetűvel történő átvitelben nélkülözhetetlen, így egy másik, addig levéltetűvel nem terjedő vírus természetes felülfertőzése esetén abban nem alakulhat ki ez a tulajdonság. (3) Hiányzik a 3’ nem kódoló régió utolsó 64 nukleotidja, ezzel együtt az ún. rekombinációs forró pont (hot spot) is (Varrelmann és mtsi, 2000), ami csökkenti a rekombináns vírusok kialakulásának esélyét (ami természetes úton kis gyakorisággal, de előfordul a vírusok között). (4) A kockázatot a PTGS-en alapuló rezisztencia jellege is csökkenti, hiszen nem halmozódik fel a transzgénről származó RNS sem (Aaziz és Tepfer, 1999). (5) A jelen munkában használt bináris vektor nem tartalmaz antibiotikum szelekciós markert.

A marker teljes mellőzésének előnye az utólagos marker eliminációs módszerekkel szemben, hogy nincs szükség genetikai szegregációra és a kimérák előfordulása szórványos. Azokra az időigényes vizsgálatokra sincs szükség, amelyekkel a marker kivágása után kiszűrik a transzpozáz vagy rekombináz által genomba visszahelyezett fragmenteket tartalmazó vonalakat.

Az általunk létrehozott transzgénikus növények rezisztenciája a géncsendesítés aktiválásán alapul. A hajtű konstrukcióban a vírusszekvencia fordított ismétlődés formában van jelen, ahol a két kópiát egy burgonyából származó intron szekvencia választja el egymástól. A fordított orientációban elhelyezkedő vírusszekvenciák egymással komplementerek, így a transzgén transzkriptumáról kettős szálú RNS alakul ki. Az intron a növényi sejt „splicing”

mechanizmusával kivágódik, a dsRNS-ből pedig PVY specifikus siRNS-ek, a géncsendesítés elicitorai képződnek. Ilyen, intront tartalmazó hajtű konstrukcióval akár 100 %-os géncsendesítés is elérhető (Smith és mtsi 2000). Az általunk vírussal inokulált 42 transzgénikus burgonya vonal közül 25 (60 %) mutatott rezisztenciát, ami a hajtű konstrukció hatékony működésére utal. Az elméleti 100 %-os hatékonyságnál alacsonyabb érték oka lehet a többkópiás beépülés, vagy a kromoszóma „csendes" részére történt integráció. A rezisztens vonalak számában az egyes fajták között meglehetősen nagy eltéréseket tapasztaltunk, a legtöbb rezisztens vonalat – 82 %-ot – a Somogyi kifli, míg a legkevesebbet – 29 %-ot – a Kisvárdai Rózsa esetében kaptuk. A fajták közötti szórás valószínű oka a rezisztenciára vizsgált vonalak kis száma. Megvizsgálva az *ipt*⁻ vonalak arányát a rezisztens vonalakon belül eredményeink azt mutatják, hogy az *ipt* gén jelenléte nem befolyásolja a vírusrezisztencia kialakulását.

Összességében elmondhatjuk, hogy az alkalmazott, shooter törzsön alapuló transzformációs rendszer öt burgonyafajta esetében hatékonyan működött, nagyszámú transzgénikus hajtást produkált és nagy valószínűséggel más fajták, esetleg fajok esetén is alkalmazható, mivel nem igényli külön regenerációs rendszer kidolgozását (hormonok használatát, antibiotikumos szelekciót).

A burgonya esetében az általánosan használt szaporítóanyag a gumó vagy minigumó, míg a palántanevelés legfeljebb a kísérletes munka során alkalmazható megoldás. A minigumók előnye a hagyományos vetőgumóhoz képest, hogy jóval kisebb területen állíthatók elő, egyszerűbben és olcsóbban tárolhatók és szállíthatók. Ezért megvizsgáltuk, hogy az alkalmazott transzformációs rendszerrel létrehozott vonalak alkalmasak-e minigumó képzésre, hiszen az *ipt* gén jelenléte befolyásolhatja a burgonya hormonháztartását.

Megállapítottuk, hogy az *ipt*-t is expresszáló transzgénikus vonalakban a minigumók átlagos mérete lecsökkent a normál fenotípusú vonalakhoz és a kontrollhoz képest. Az 5 mm alatti gumók feltehetően fejletlenségükből adódóan a hajtásról leválasztva gyakran elpusztultak. Az *ipt* gén expressziója következtében a citokinin túltermelődés a hajtás fejlődésén kívül a gumóképzésre is kedvezőtlenül hatott. Azokban a vonalakban azonban, ahol az *ipt*-specifikus fragment PCR-rel kimutatható volt, de a gén nem nyilvánult meg, vagyis normális hajtás fejlődött, a minigumó képzés is a kontrollhoz és az *ipt*⁻ vonalakhoz hasonlóan alakult. A minigumó indukció az általunk alkalmazott rendszerben létrehozott transzgénikus növényekben működőképes maradt, ilyen módon megfelelő minőségű és mennyiségű gumó előállítható. A rezisztencia teszthez szükséges növények előállítására azonban a

palántanevelés megfelelőbb módszer, amellyel a gumók előállításához képest jelentős idő takarítható meg.

A jövőben a vizsgálatok kiterjeszthetők vektor szekvenciák esetleges jelenlétének detektálására. Ismert, hogy a T-DNS Ti plazmidról történő kivágódása nem mindig pontosan a határszekvenciák között történik, hanem egyes esetekben az azokon túli DNS-szakaszok is kivágódnak és integrálódnak. Francis és Spiker (2005) vizsgálatai alapján a PCR-rel azonosított transzgénikus vonalak 68 %-a vektor szekvenciát is tartalmazott, ami hasonló a Wenck és mtsi (1997) által tapasztalt arányhoz. A markerek mellett a vektor szekvenciák eliminálása is elősegítheti a transzgénikus növények társadalmi elfogadottságát.

5.2. Hibrid PVY klónok előállítása és a rekombináns vírusok vizsgálata tesztnövényeken és transzformáns burgonyavonalakon

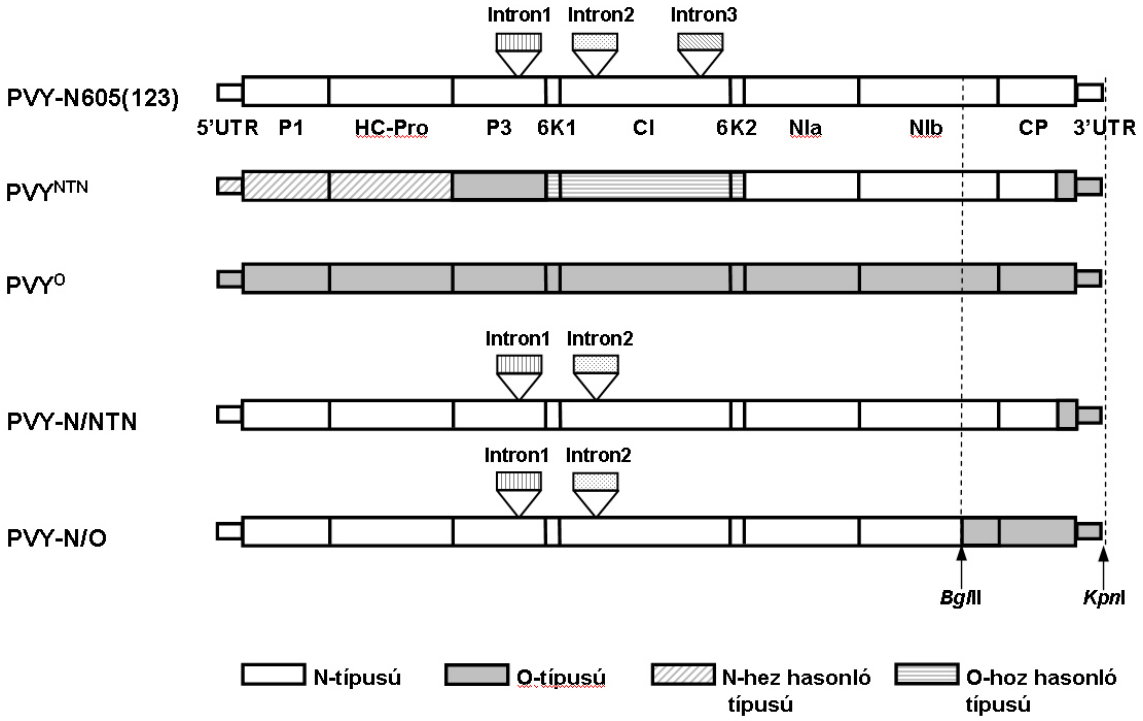
A munka ezen részének célja az volt, hogy stabil PVY kiméra cDNS klónokat hozzunk létre, majd a PVY^{NTN} illetve PVY^{O} törzsek kicserélt NIb 3' része, CP és 3'NTR régiójának hatását vizsgáljuk a fertőzőképességre és a tünetkialakításra. A munka első része során előállított transzgénikus burgonya vonalakban megvizsgáltuk a rezisztencia stabilitását a hibrid és a szülői vírustörzsekkel szemben. A munka elkezdéséig (2003) nem publikáltak olyan kutatási eredményeket, amelyben a PVY fertőzőképes klónját felhasználva végeztek funkcionális genomanalízist, más potyvírusok genetikai determinánsainak funkcióiról több információ állt rendelkezésre.

Az első fertőzőképes stabil PVY klónt Jakab Gábor és munkatársai 1997-ben publikálták. A viszonylag késői időpont oka a teljes vírusgenom cDNS-ének *E. coli*-ban való nagyfokú instabilitása, ami nagy valószínűséggel a vírus genomjáról származó toxikus fehérjetermékek képződésével magyarázható (Fakhfakh és mtsi, 1996; Jakab és mtsi, 1997). A probléma megoldásaként a vírus genomját a feltételezetten toxikus CI protein régióban két részre osztották – ilyen módon fenntartható volt baktériumban – majd közvetlenül inokulálás előtt ligálták a két fragmentet. Ennél elegánsabb megoldás a teljes klón stabilizálására intronok beépítése, aminek következtében a feltételezett toxikus gének baktériumban való expressziója gátolt. A növényi sejtben a cDNS-ről átíródó RNS érése során fertőzőképes vírus RNS alakul ki. A fent említett PVY klónba Elisabeth Johansen épített be 3 intront a korábban a PSbMV esetében alkalmazott módon (Johansen, 1996; Bukovinszki és mtsi, 2007). Ez képezte a jelen munka kiindulási alapját, melynek során két mesterséges rekombináns PVY

cDNS klónt állítottunk elő. A hibrid cDNS klónok, amelyek két intront, és PVY^N háttérben a PVY^{NTN}, illetve a PVY^O genom 3' végi 1568 nukleotidját tartalmazták, megőrizték fertőzőképességüket, amit *N. benthamiana* növényeken „génbelövést" követő fertőzés előidézésével igazoltunk. Az általunk kialakított klónok szisztemikus fertőzésének hatékonysága ugyan elmaradt az eredeti PVY-N605(123) klónétól, de az inokulált növényekről továbbvitt vírusok fertőzőképessége már hasonló volt, mint az eredeti törzseké. A génbelövést követő csökkent fertőzőképesség okaként a létrehozott rekombináns genom új tulajdonságain kívül a genom más régióiban bekövetkezett mutáció vagy a génbelöveses technikából adódó hibalehetőség is felmerül. A vírusok továbbvitele során tapasztalt jó fertőzőképesség az utóbbi lehetőséget valószínűsíti.
A hibridek köpenyfehérje régiójának számos passzálás után történt újraszekvenálásakor kapott eredmény alapján azt mondhatjuk, hogy a hibridek hosszú időn keresztül megőrizték stabilitásukat: mindössze két pontmutációt detektáltunk a PVY-N/NTN hibrid ezen régiójában két éven át történő fenntartás után, míg a PVY-N/O hibrid esetén egyet sem találtunk.

Irodalmi adatok szerint az Európában előforduló PVY^{NTN} izolátumok a PVY^N és a PVY^O törzsek természetes rekombinánsai, amelyek genomjában négy rekombinációs pontot azonosítottak: a HC-Pro/P3 határán, a P3/6K1 határán, a 6K2/NIa határán, és a CP 3' régiójában (Revers és mtsi, 1996; Glais és mtsi, 2002; Schubert és mtsi, 2007) (5.1 ábra).
Ennek alapján az általunk készített kimérákban a kicserélt genomi régió eleje, vagyis a 3'NIb és a CP első 600 nukleotidnyi szakaszának szekvenciája szinte teljesen megegyezik a PVY^N megfelelő szakaszának szekvenciájával, míg az utolsó kb. 530 nukleotid (a CP utolsó 200 bp-ja és a 3'NTR) tipikusan a PVY^O törzsre jellemző szekvencia (5.1 ábra). Ezek alapján a PVY-N/NTN szekvenciája PVY^N típusú az utolsó 530 nukleotid kivételével, amely szakasz a PVY^O-ra jellemző, míg a PVY-N/O hibridben a genom 3' végének 1568 nukleotidja PVY^O-típusú (az NIb 3' végi 468 nukleotidja, a teljes CP és a teljes 3'NTR).

A biológiai tesztek során a hat vizsgált gazdanövényfaj közül ötben azt találtuk, hogy a tünetek a hibridek és a PVY^N esetében hasonlóak voltak. Ezeket a fajokat a három szülői és a két rekombináns vírussal fertőzve csak az egyik vírus indukált a többihez képest eltérő reakciót: a *N. tabacum*-ban és *S. tuberosum*-ban a PVY^O, a *N. benthamiana*-ban, *N. glutinosa*-ban *és P. pubescens*-ben pedig a PVY^{NTN}. A *P. floridana* esetében azonban azt tapasztaltuk, hogy a PVY-N/O hibrid által okozott tünetek a 3'NIb-CP-3'NTR-t adó szülői törzs (PVY^O) okozta tünetekhez hasonlítottak, nem pedig a PVY^N által okozotthoz, azaz bizonyos tünetek előfordulása összefüggésben volt a 3' végen PVY^O szekvencia jelenlétével.



5.1 ábra. A szülői és hibrid vírusok szekvenciahomológia viszonyainak bemutatása Glais és mtsi (2002) szekvenciavizsgálatai alapján. Az ára a 4.8 ábra módosított változata a PVY^{NTN} genom rekombináns természetének figyelembe vételével, amiből a PVY-N/NTN hibrid homológia viszonyai is következnek. A hibridekben kicserélt genomi régiót a BglII és KpnI hasítóhelyek határolják.

A *P. floridana*-n kapott eredmények és az 5.1 ábra alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a PVY^{NTN} utolsó 530 bp-nyi szakasza nem játszik szerepet az erre a törzsre jellemző tünetek kialakításában ennél a gazdanövénynél, mivel az ugyanúgy reagált a PVY^{N}-re és a PVY-N/NTN-re. A PVY-N/O kiméra esetében azonban, amely a teljes CP-ben és 3'NIb-ben PVY^{O} szekvenciát tartalmaz, a PVY^{O} „szülőhöz" nagyon hasonló tüneteket figyeltünk meg. Ebben a rekombinánsban a genom többi része PVY^{N} szekvenciát tartalmaz, így levonhatjuk azt a következtetést, hogy a PVY^{O} patológiai jellemzőinek kialakításában a 8136 - 9170 nukleotid közötti régió fontos szerepet játszik. Ez a régió az NIb 3' és a CP 5' részének felel meg. Az NIb RNS-függő RNS polimerázt kódol, de a tünetkialakításban játszott szerepéről nincsenek adatok. Ettől függetlenül nem lehet kizárni ezt a lehetőséget sem. A CP tünetkialakításban betöltött szerepéről több szerző is beszámol (Andrejeva és mtsi, 1999; Ullah és Groumet, 2002), ami alapján valószínűsíthetjük, hogy a CP első 600 nukleotidjának szerepe feltehetően meghatározóbb a PVY^{O} patológiájában, mint az NIb kódoló régióé.

A két rekombináns és három szülői vírustörzs birtokában megvizsgáltuk, hogy az általunk előállított transzgénikus burgonya vonalak, amelyek PVY^{NTN}-re rezisztensek, ellenállóak-e a

másik négy vírussal szemben is, hiszen természetes fertőzéskor nem csak egyetlen PVY izolátummal találkozhat a növény. A PVY-N/NTN és PVY-N/O hibrid vírusok elméletileg a természetben lezajlott rekombináció következtében is létrejöhettek volna, így ezekkel még szélesebb körre kiterjeszthető a rezisztencia spektrumának vizsgálata. A rezisztencia tesztbe bevont három transzgénikus burgonya vonal vizsgálata során egyik vírus sem törte át a PVY^{NTN} szekvencia által kiváltott – minden bizonnyal géncsendesítésen alapuló – rezisztenciát.

Souza és Gonsalves (2005) papaya gyűrűsfoltosság vírusra (*Papaya ringspot virus* - PRSV) rezisztens transzgénikus papaya fajtákat vizsgálva 89 %-os szekvenciahomológia esetén már találtak rezisztenciát áttörő izolátumokat. Esetünkben a PVY^{NTN}-ből származó transzgén és a PVY^{O} törzs (AJ585196) azonos szakasza közti homológia 96 % volt, a PVY^{N} törzzsel (X97895) való illesztés pedig 93,5 % homológiát mutatott. A rekombinánsok közül a PVY-N/O esetén a kicserélt szakasz (amely PVY^{O}-szekvencia) teljesen lefedi a transzgénnek megfelelő régiót, így itt is 96 % volt a homológia. Irodalmi adatok alapján a CP különböző régióinak eltérő fokú homológiája (Souza és Gonsalves, 2005) játszik szerepet a rezisztencia áttörésében, ami vírusonként különböző lehet. Transzgénikus növényeink rezisztencia vizsgálatai során azonban a szekvencia homológia alapján feltételezett eredményeket kaptuk, azaz a transzgénikus rezisztencia mindegyik vírustörzs ellen hatékonyan működött.

Ennek az értekezésnek a keretein túlmutató feladatként érdemes lenne a rezisztencia spektrumát más, rokon vírusfajokkal szemben is vizsgálni, hiszen minél szélesebb körű a védettség, ezek a transzgénikus vonalak annál értékesebbek lehetnek a mezőgazdasági gyakorlat számára. Ehhez azonban a társadalmi elfogadottságot növelni kell, amihez példaként szolgálhatnak az általunk létrehozott, környezetbiztonsági szempontból kiemelkedő, vírusrezisztens burgonyanövények.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A burgonyát károsító vírusokkal szemben a leghatékonyabb védekezési mód rezisztens fajták termesztése, ám a hagyományos nemesítés hosszú és munkaigényes folyamat. Célunk volt, hogy molekuláris biológiai és biotechnológiai eszközök segítségével a burgonya Y vírussal (PVY) szemben hatékony védettséget alakítsunk ki biztonságos génkonstrukcióval burgonyában. Az elkészített konstrukció legfontosabb jellemzői: 1) nem transzlálódó formában tartalmazza a PVY^{NTN} CP és 3'NTR 821 bp-nyi szakaszát, 2) a beépített vírusszekvenciából hiányzik a levéltetű átvitelhez szükséges aminosav motívum és a rekombinációs forró pont, 3) hajtű struktúrájú, ami a növényi géncsendesítési mechanizmus aktiválásán keresztül alakítja ki a rezisztenciát, 4) nem tartalmaz szelekciós markert. Transzformációs rendszerünk egy ún. shooter mutáns *Agrobacterium* törzs használatán alapult, amelyben az *ipt* gén expressziója járulékos hajtásképződést indukál hormonmentes táptalajon. A regeneráció az ipt^+ sejtek környezetében lévő ipt^-/YCP^+ sejtekből is megindul, ami lehetővé teszi a marker gének használatának mellőzését. A hajtű konstrukciót hordozó shooter törzzsel négy régi magyar (Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba, Somogyi kifli) és egy amerikai (Russet Burbank) burgonyafajtát transzformáltunk. A Mindenes kiemelkedően jól regenerált (5,7 hajtás/explant), de a regenerációs hatékonyság a többi fajtánál is jó volt. Mintegy 3000 regenerált hajtásból 1300-at teszteltünk a transzgén jelenlétére PCR-rel, az öt fajta átlagos transzformációs rátája 16 % volt. A részletesen vizsgált pozitív vonalak egyharmada a transzgént a kívánatos, YCP^+/ipt^- konfigurációban hordozta. Az eredményeket összegezve 3-8 % gyakoriságban kaptunk marker mentes transzgénikus vonalakat. A vírussal inokulált 42 vonal 60 %-a mutatott rezisztenciát, ami a hajtű konstrukció hatékony működését igazolja.

A munka másik részében két mesterséges hibrid PVY cDNS klónt állítottunk elő, amelyek baktériumban való fenntartását intronok beépítésével stabilizáltuk. A PVY-N/NTN és PVY-N/O hibridek, amelyekben a vírusgenom 3' végén 1568 bázispárnyi PVY^{NTN}, ill. PVY^O szekvencia található PVY^N háttérben, megőrizték fertőzőképességüket. Megállapítottuk, hogy a *Physalis floridana* hibrid és szülői vírusokra adott reakciói alapján a PVY^O patológiai tulajdonságainak kialakításában a vírus köpenyfehérje első 600 nukleotidja fontos szerepet játszik. A munka első részében előállított transzgénikus burgonyavonalakon végzett rezisztenciavizsgálatok alapján a PVY^{NTN} köpenyfehérje részletet tartalmazó hajtű konstrukció a kísérletbe bevont öt vírustörzs (PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^O, PVY-N/NTN, PVY-N/O) ellen védettséget biztosított.

7. SUMMARY

The most effective way to fight against plant viruses is growing virus resistant crops. Conventional breeding is labor-intensive and time consuming; therefore we aimed to develop efficient resistance against PVY in potato via biotechnology. We used an environmentally safe transgene construct with the following features: 1) it contains a non-translating 821 base pair PVY^{NTN} fragment, comprising part of the coat protein and the 3'NTR region, 2) the recombination hot spot and the DAG motif of the CP, responsible for aphid transmission were omitted, 3) the PVY-CP hairpin structure confers resistance via RNA silencing, the plants' natural antiviral mechanism, 4) it does not contain conventional selection markers. For plant transformation we used a shooter mutant *Agrobacterium*. The expression of the *ipt* gene of the shooter strain induces adventitious shoot production in the absence of exogenous phytohormones. Regeneration occurs also from neighbouring YCP^{+}/ipt^{-} cells of the cytokinin producing ipt^{+} cells, which makes it possible to use a marker free construct. We transformed four Hungarian (Mindenes, Kisvárdai Rózsa, Gülbaba, Somogyi kifli) and the American Russet Burbank potato cultivars using the GV3170 shooter strain containing the PVY CP hairpin construct. The Mindenes variety produced the best regeneration rate (5,7 shoots/explant), however, efficiency of the other varieties was also good. We PCR tested 1300 shoots of the 3000 regenerants for the presence of the transgene and the average transformation rate of the five varieties reached 16 %. One third of the further analyzed lines carried the transgene in the desirable asymmetric configuration (YCP^{+}/ipt^{-}). To summarize our results, we obtained marker-free transgenic potato lines with a transformation rate of 3-8 %. Out of the 42 lines tested, 60 % turned out to be virus resistant, which proves the efficiency of the hairpin construct.

In the second part of the work we analyzed the effect of virus recombination on infectivity and symptomatology using infectious cDNA clones. We constructed two recombinant PVY cDNA clones, their stability in bacteria was enhanced by inserting two introns. The PVY-N/NTN and PVY-N/O chimeras containing 1568 bp of PVY^{NTN} or PVY^{O} sequences at the 3' end of the genome in a PVY^{N} background remained infectious. We analyzed the symptomatology of the chimeras on different host species and concluded that the first 600 nt of the CP plays an important role in symptom formation of PVY^{O} in *Physalis floridana*. The transgenic potato lines generated in the first part of this work showed resistance against all the parental and hybrid viruses (PVY^{N}, PVY^{NTN}, PVY^{O}, PVY-N/NTN, PVY-N/O).

MELLÉKLETEK

1. sz. Melléklet.

A PVY-N/NTN hibrid előállítása során felhasznált PVY^{NTN} izolátum (DSMZ azonosító: PV-0403) 3' végi 1568 nukleotid hosszú szekvenciájára BLAST programmal (Altschul és msti, 1990) kapott első találat és a két szekvencia illesztése.

```
>  gb|M95491.1|PVYPOLYP  Potato virus Y polyprotein gene, complete cds
Length=9703

 Score = 2846 bits (1541),  Expect = 0.0
 Identities = 1559/1568 (99%), Gaps = 0/1568 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     AGATCTTGGTTTGAACTATGATTTTTCGTCGAGAACAAGAAGGAAGGAGGAATTGTGGTT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8136  AGATCTTGGTTTGAACTATGATTTTTCGTCGAGAACAAGAAGGAAGGAGGAATTGTGGTT  8195

Query  61    CATGTCCCATAGAGGCCTGCTAATCGAGGGTATGTACGTGTCAAAGCTTGAAGAAGAGAG  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  8196  CATGTCCCATAGAGGCCTGCTAATCGAGGGTATGTACGTGCCAAAGCTTGAAGAAGAGAG  8255

Query  121   AATTGTATCCATTTTGCAATGGGATAGAGCTGATCTGCCAGAGCACAGATTAGAAGCGAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8256  AATTGTATCCATTTTGCAATGGGATAGAGCTGATCTGCCAGAGCACAGATTAGAAGCGAT  8315

Query  181   CTGTGCAGCAATGATAGAATCCTGGGGTTATTCTGAGTTAACGCACCAAATCAGGAGATT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8316  CTGTGCAGCAATGATAGAATCCTGGGGTTATTCTGAGTTAACGCACCAAATCAGGAGATT  8375

Query  241   CTACTCATGGTTGTTGCAACAGCAACCTTTTTCAACGATAGCACAGGAAGGAAAAGCTCC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8376  CTACTCATGGTTGTTGCAACAGCAACCTTTTTCAACGATAGCACAGGAAGGAAAAGCTCC  8435

Query  301   ATACATAGCGAGCATGGCATTGAAGAAGCTGTACATGAACAGGACAGTAGATGAGGAGGA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8436  ATACATAGCGAGCATGGCATTGAAGAAGCTGTACATGAACAGGACAGTAGATGAGGAGGA  8495

Query  361   AATGAAGGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTA  420
             | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8496  ACTGAAGGCTTTCACTGAAATGATGGTTGCCTTGGATGATGAACTTGAGTGCGATACTTA  8555

Query  421   TGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8556  TGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCACTAAGAAGGATGC  8615

Query  481   AAAACAAGAGCAAAGTAGCATTCAACCAAATCCCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAA  540
             |||||||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8616  AAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAAATCTCAACAAGGAAAAGGAAAAGGACGTGAA  8675

Query  541   TGTTGGAACATCTGGAACTCATACTGTGCCACGAATTAAAGCTATCACGTCCAAAATGAG  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8676  TGTTGGAACATCTGGAACTCATACTGTGCCACGAATTAAAGCTATCACGTCCAAAATGAG  8735

Query  601   AATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAGCTGTACTAAATTTGAAACACTTGCTCGAGTATGCTCC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8736  AATGCCCAAGAGTAAAGGTGCAGCTGTACTAAATTTGAAACACTTGCTCGAGTATGCTCC  8795

Query  661   ACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8796  ACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGA  8855
```

```
Query  721   AGCGGTACAACTTGCATACGACATAGGAGAAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCT  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8856  AGCGGTACAACTTGCATACGACATAGGAGAAACTGAAATGCCAACTGTGATGAATGGGCT  8915

Query  781   TATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGAT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8916  TATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGAT  8975

Query  841   GGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAAC  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8976  GGATGGAGATGAACAAGTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAAC  9035

Query  901   ACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAA  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9036  ACTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAA  9095

Query  961   CAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9096  CAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTGCGCGATGGAAGTTT  9155

Query  1021  GGCTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGA  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9156  GGCTCGCTATGCTTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGA  9215

Query  1081  AGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTT  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9216  AGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTT  9275

Query  1141  GGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTC  1200
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9276  GGACGGTGGCATTAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTC  9335

Query  1201  TCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTAAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACGA  1260
             |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9336  TCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACGA  9395

Query  1261  TATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCATA  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9396  TATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCATA  9455

Query  1321  ATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTCGCCATTGT  1380
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  9456  ATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTCGTCATTGT  9515

Query  1381  GGTGACTCTATCTGTTAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGT  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9516  GGTGACTCTATCTGTTAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGT  9575

Query  1441  TGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTC  1500
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9576  TGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTC  9635

Query  1501  TGGATCTATCTACTTGGGTGATGTTGTGATTTCGTCATAACAGTGACTGTAAACTTCAAT  1560
             |||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  9636  TGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTTGTGATTTCGTCATAACAGTGACTGTAAACTTCAAT  9695

Query  1561  CAGGAGAC  1568
             ||||||||
Sbjct  9696  CAGGAGAC  9703
```

2. sz. Melléklet.

A PVY-N/O hibrid előállítása során felhasznált PVY^{O} izolátum (DSMZ azonosító: PV-0343) 3’ végi 1568 nukleotid hosszú szekvenciájára BLAST programmal (Altschul és msti, 1990) kapott első találat és a két szekvencia illesztése.

```
>  dbj|AB185832.1|  Potato virus Y gene for polyprotein precursor (P1
protein, helper component protein, P3 protein, NIb replicase, coat
protein), partial cds, 3'UTR, isolate:SYR-Wi-11
Length=8757

 Score = 2835 bits (1535),  Expect = 0.0
 Identities = 1557/1568 (99%), Gaps = 0/1568 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     AGATCTTGGTTTGAACTATGATTTCTCGTCAAGAACAAGAAATAAGGAGGAGTTGTGGTT  60
             |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7190  AGATCTTGGTTTGAATTATGATTTCTCGTCAAGAACAAGAAATAAGGAGGAGTTGTGGTT  7249

Query  61    TATGTCTCATAGAGGCCTACTGATTGAGGGCATGTACGTGCCGAAACTTGAAGAAGAGAG  120
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  7250  TATGTCTCATAGAGGCCTACTGATTGAGGGCATGTACGTGCCGAAACTTGAAGAAGAAAG  7309

Query  121   GATTGTGTCCATTCTCCAATGGGACAGAGCAGACTTGGCTGAACACAGGCTTGAGGCGAT  180
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  7310  GATTGTGTCCATTCTCCAATGGGACAGAGCAGACTTGGCTGAACATAGGCTTGAGGCGAT  7369

Query  181   TTGCGCAGCTATGATAGAGTCCTGGGGTTATTCTGAACTAACACACCAAATCAGGAGATT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7370  TTGCGCAGCTATGATAGAGTCCTGGGGTTATTCTGAACTAACACACCAAATCAGGAGATT  7429

Query  241   CTACTCATGGTTATTGCAACAGCAACCCTTTGCAACAATAGCGCAGGAAGGGAAGGCTCC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7430  CTACTCATGGTTATTGCAACAGCAACCCTTTGCAACAATAGCGCAGGAAGGGAAGGCTCC  7489

Query  301   TTATATAGCAAGCATGGCATTAAGGAAATTGTATATGGATAGGGCTGTGGATGAGGAAGA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7490  TTATATAGCAAGCATGGCATTAAGGAAATTGTATATGGATAGGGCTGTGGATGAGGAAGA  7549

Query  361   GCTGAGAGCCTTCACTGAAATGATGGTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTA  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7550  GCTGAGAGCCTTCACTGAAATGATGGTCGCATTAGACGATGAGTTTGAATTTGACTCTTA  7609

Query  421   TGAAGTACACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGC  480
             ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7610  TGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGAGGAAGCAGCAAGAAAGATGC  7669

Query  481   AAAACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCAAACCTGAACAAAGGAAGAGATAAGGATGTGAA  540
             || |||||||||||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  7670  AAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCAAACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAA  7729

Query  541   TGCTGGTACATCTGGTACACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAG  600
             |||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7730  TGCTGGTACATCTGGGACACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAG  7789

Query  601   AATGCCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCTCC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7790  AATGCCCAAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCTCC  7849

Query  661   ACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7850  ACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGA  7909
```

```
Query  721   GGCAGTGCGGATGGCATACGACATAGGAGAAACTGAGATGCCAACTGTGATGAATGGGCT  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7910  GGCAGTGCGGATGGCATACGACATAGGAGAAACTGAGATGCCAACTGTGATGAATGGGCT  7969

Query  781   TATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGAT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  7970  TATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGAT  8029

Query  841   GGATGGGAATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAAC  900
             ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8030  GGATGGGGATGAACAAGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAAC  8089

Query  901   CCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAA  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8090  CCTTAGGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCAA  8149

Query  961   CAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8150  CAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGATGTGGGTTT  8209

Query  1021  AGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGA  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8210  AGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGA  8269

Query  1081  AGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTT  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8270  AGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTT  8329

Query  1141  GGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTC  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8330  GGACGGTGGCATCAGTACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTC  8389

Query  1201  TCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACGA  1260
             |||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8390  TCCAAGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACGA  8449

Query  1261  TATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCATA  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8450  TATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTTTTATCATA  8509

Query  1321  ATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTCGTCATTGT  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8510  ATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTCGTCATTGT  8569

Query  1381  GGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGGTAAAAGTGCCGGGTTGTCGT  1440
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  8570  GGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGT  8629

Query  1441  TGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTC  1500
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8630  TGTTGTGGATGATTCATCGATTAGGTGATGTTGCGATTCTGTCGTAGCAGTGACTATGTC  8689

Query  1501  TGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTTGTGATTTCGTCATAACAGTGACTGTAAACTTCAAT  1560
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  8690  TGGATCTATCTGCTTGGGTGGTGTTGTGATTTCGTCATAACAGTGACTGTAAACTTCAAT  8749

Query  1561  CAGGAGAC  1568
             ||||||||
Sbjct  8750  CAGGAGAC  8757
```

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Tudományos cikkek:

Ágnes Bukovinszki, Zoltán Divéki, Márta Csányi, László Palkovics, Ervin Balázs: „Engineering resistance to PVY in different potato cultivars in a marker-free transformation system using a 'shooter mutant' *A. tumefaciens*." Plant Cell Reports 26 (2007) 459–465

Ágnes Bukovinszki, Reinhard Götz, Elisabeth Johansen, Edgar Maiss, Ervin Balázs: „The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVY strains". Virus Research 127 (2007) 122–125

Konferencia előadások:

Bukovinszki Ágnes, Reinhard Götz, Edgar Maiss, Balázs Ervin: „A burgonya Y vírus köpenyfehérje hibridjeinek előállítása és fertőzőképességük vizsgálata." 51. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, Hungary, 2005

Ágnes Bukovinszki, Reinhard Götz, Elisabeth Johansen, Edgar Maiss, Ervin Balázs „Generating and studying the infectivity of coat protein chimeras of *Potato virus Y*." Congress of the Hungarian Microbiological Society and the 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, 2005

Konferencia poszterek:

Bukovinszki Ágnes, Divéki Zoltán, Csányi Márta, Palkovics László, Balázs Ervin: „Burgonya Y vírus elleni rezisztencia kialakítása különböző burgonyafajtákban shooter mutáns agrobaktériummal marker mentes transzformációs rendszerben." XI. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, 2005

Ágnes Bukovinszki, Reinhard Götz, Elisabeth Johansen, Edgar Maiss, Ervin Balázs: „Generating and studying the infectivity of coat protein chimeras of *Potato virus Y*."
XIII. International Congress of Virology, San Francisco, USA, 2005

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban Dr. Balázs Ervin témavezetőmnek, hogy 2001-ben befogadott a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont akkori Virológia csoportjába, és megteremtette a lehetőségeket disszertációm elkészítéséhez. Munkám során mindvégig, a martonvásári MTA MGKI-hoz való távozása után is támogatott. Köszönettel tartozom Dr. Gyurján István korábbi, és Dr. Szigeti Zoltán jelenlegi doktori programvezetőimnek, hogy lehetővé tették a Kísérletes Növénybiológia Doktori Programban való részvételemet, és munkám során végig támogattak.

Külön köszönöm Csányi Mártának a szövettenyésztési munkákban nyújtott felbecsülhetetlen értékű szakmai segítsége mellett baráti támogatását. Végtelenül hálás vagyok Dr. Dudás Brigittának a cikkek és a dolgozat írása során nyújtott rengeteg tanácsért, nagyon sokat tanultam ezekből. Köszönöm továbbá Dr. Palkovics Lászlónak, Dr. Salánki Katalinnak, Dr. Divéki Zoltánnak, Dr. Huppert Emesének, Kiss Lászlónak, Nádudvariné Novák Julikának és minden egykori kollégámnak a munkám során nyújtott értékes elméleti és gyakorlati segítséget, valamint azt, hogy velük kellemes légkörben dolgozhattam az évek során.

Nem feledkezhetem meg a Hannoveri Egyetem Növénykórtani és Növényvédelmi Intézetének (IPP) munkatársairól sem, akikkel 5 szép hónapot töltöttem el sok szakmai tapasztalatot és új barátokat szerezve. Mindenekelőtt Dr. Edgar Maissnak vagyok hálás, hogy befogadott csoportjába és végig mindenben támogatott.

IRODALOMJEGYZÉK

Aaziz R, Tepfer M (1999) Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. J Gen Virol 80: 1339-1346

Allison RF, Schneider WL, Deng M (1999) Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. In Proceedings of the 5th International Symposium on Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms, Braunschweig. Szerk: J. Schiemann, R. Casper.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215: 403-10

An G, Watson BD, Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato, and Arabidopsis thaliana using a binary Ti vector system. Plant Physiol 81: 301-305

Andrejeva J, Puurand Ü, Merits A, Rabenstein A, Järvekülg L, Valkonen JPT (1999) Potyvirus HC-Pro and CP proteins have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. J Gen Virol 80: 1133-1139

Arbatova J, Lehto K, Pehu E, Pehu T (1998) Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. J Gen Virol 79: 2319-2323

Atreya CD, Raccah B, Pirone TP (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. Virology 178: 161-165

Aziz N, Machray GC (2003) Efficient male germ line transformation for transgenic tobacco production without selection. Plant Mol Biol 51: 203-211

Ballester A, Cervera M, Peña L (2007) Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. Plant Cell Rep 26: 39-45

Banerjee AK, Prat S, Hannapel DJ (2006) Efficient production of transgenic potato (S. tuberosum L. ssp. andigena) plants via Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation Plant Sci 170: 732-738

Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. Proc Natl Acad Sci USA 81: 4776-4780

Beczner L, Horváth J, Romhányi I, Förster H (1984) Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. Potato Res 27: 339-352

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409: 363-366

Boscariol RL, Almeida WA, Derbyshire MT, Mourão Filho FA, Mendes BM. (2003) The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (Citrus sinensis L. Osbeck). Plant Cell Rep 22:122-128

Boyer J-C, Haenni A-L (1994) Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. Virology 198: 415-426

Braun CJ, Hemenway CL (1992) Expression of amino-terminal portions of full length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. Plant Cell 4: 735-744

Bucher E, Lohuis D, van Poppel PMJA, Geerts-Dimitriadou C, Goldbach R, Prins M (2006) Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. J Gen Virol 87: 3697-3701

Bukovinszki Á, Götz R, Johansen E, Maiss E, Balázs E (2007) „The role of the coat protein region in symptom formation on Physalis floridana varies between PVY strains". Virus Res 127: 122-125

Carrington JC, Freed DD (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. J Virol 64: 1590-1597

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805

Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1991-1995

Clark MF Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant. J Gen Virol 34: 475-483

Coenen C, Lomax T (1997) Auxin-cytokinin interaction in higher plants: old problems and new tools. Trends Plant Sci 2: 351-355

Craig W, Tepfer M Degrassi G Ripandelli D (2008) An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops Euphytica DOI 10.1007/s10681-007-9643-8

Cziklin M, Horváth J, Kadlicskó S, Pintér Cs, Polgár Zs, Wolf I (2005) A burgonya védelme. Növényvédelem 41 (8)

Dale EC, Ow DW (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. Proc Natl Acad Sci USA 88: 10558-10562

Davies PE (szerk.) (1995) Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluver Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands

Day A, Kode V, Madesis P, Iamtham S (2005) Simple and efficient removal of marker genes from plastids by homologous recombination. In: Methods in Molecular Biology (szerk: Peña L), Volume 286, Transgenic Plants: Methods and Protocols, Humana Press

De Bokx JA, Huttinga H (1981) Potato Virus Y. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 242.

De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R (2003) A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. Nat Biotechnol 21: 439-442

Dietrich C, Maiss E (2002) Red fluorescent protein DsRed from Discosoma sp. as a reporter protein in higher plants. Biotechniques 32: 286-291

Dietrich C, Maiss E (2003) Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected Nicotiana benthamiana plants. J Gen Virol 84: 2871-2876

Dietrich C, Miller J, McKenzie G, Palkovics L, Balázs E, Palukaitis P, Maiss E (2007) No recombination detected in artificial potyvirus mixed infections and between potyvirus derived transgenes and heterologous challenging potyviruses. Environ Biosafety Res 6: 207-18

Domínguez A, Fagoaga C, Navarro L, Moreno P, Peña L (2002) Regeneration of transgenic citrus plants under non selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes. Mol Genet Genomics 267: 544–556

Dougherty WG, Carrington JC (1988) Expression and function of potyviral gene products. Ann Rev Phytopathol 26: 123-143

Dougherty WG, Parks TD (1991) Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. Virology 183: 449-56

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997a) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2117-2121

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M, Komamine A (1997b) Principle of MAT vector. Plant Biotechnol 14: 133-139

Edwardson JR, Christie RG (1997) Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. Volume II, Florida Agricultural Experiment Station, Monograph 18-II.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 15: 188-200

Fakhfakh H, Vilaine F, Makni M, Robaglia C (1996) Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. J Gen Virol 77: 519-523

Feki S, Loukili MJ, Triki-Marrakchi R, Karimova G, Old I, Ounouna H, Nato A, Nato F, Guesdon J-L, Lafaye P, Ben Ammar Elgaaied A (2005) Interaction between tobacco ribulose-l,5-biphosphate carboxylase/ oxygenase large subunit (RubisCO-LSU) and the PVY coat protein (PVY-CP). Eur J Plant Pathol 112: 221-234

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391: 806-11

Fladung M (1999) Gene stability in transgenic aspen (Populus). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. Mol Gen Genet 260: 574-581

Flasinski S, Cassidy BG (1998) Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. Arch Virol 143: 2159-2172

Francis KE, Spiker S (2005) Identification of Arabidopsis thaliana transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. Plant J 41: 464-477

Fuchs M, Gonsalves D (2007) Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. Annu Rev Phytopathol 45: 173-202

Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In Vitro 12: 473-478

Gargouri-Bouzid R, Jaoua L, Ben Mansour R, Hathat Y, Ayadi M, Ellouz R (2005) PVY resistant transgenic potato plants (cv. Claustar) expressing the viral coat protein. J Plant Biotech 3: 1-5

Glais L, Tribodet M, Kerlan C (2002) Genomic variability in Potato virus Y (PVY): evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. Arch Virol 147: 363-378

Gray DJ, Hiebert E, Lin CM, Compton ME, McColley DW, Harrison RJ, Gaba VP (1994) Simplified construction and performance of a device for particle bombardment. Plant Cell Tissue Organ Cult 37: 179-184

Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998) The xylose isomerase gene from Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. Plant Mol Biol 37: 287-296

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286: 950-952

Hansen J, Nielsen B, Nielsen SVS (1999) In vitro shoot regeneration of Solanum tuberosum cultivars: interactions of medium composition and leaf, leaflet, and explant position. Potato Res 42: 141-151

Harrison BD, Roberts IM (1971) Pinwheels and crystalline structures induced by atropa mild mosaic virus with particles 925 nm long. J Gen Virol 10: 71-78

Hassairi A, Masmoudi K, Albouy J, Robaglia C, Jullien M, Ellouz R (1998) Transformation of two potato cultivars `Spunta' and `Claustar' (Solanum tuberosum) with lettuce mosaic virus coat protein gene and heterologous immunity to potato virus Y. Plant Sci, Limerick, 136: 31-42

Hemenway C, Fang RF, Kaniewski WK, Chua NH, Tumer NE (1988) Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. EMBO J 7: 1273-1280

Heszky L, Fésűs L, Hornok L (szerk.) (2005) Mezőgazdasági Biotechnológia. Agroinform Kiadó

Hohn B, Levy AA, Puchta H (2001) Elimination of selection markers from transgenic plants. Curr Opin Biotech 12: 139-143

Hollings M, Brunt AA (1981) Potyvirus group. CMI/AAB Description of Plant Viruses #245: 7pp.

Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, Depicker A, Inzé D, Engler R, Villaroel R, Van Montagu M, Schell J (1980) The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. Plasmid 3: 212-230

Hong X-Y, Chen J, Shi Y-H, Chen J-P (2007) The ‘6K1’ protein of a strain of Soybean mosaic virus localizes to the cell periphery. Arch Virol 152: 1547-1551

Horváth J (1995) A szántóföldi növények betegségei. Mezőgazda kiadó, Budapest

Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucl Acids Res 20: 9877

Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccah B (1994) Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. J Gen Virol 75: 1407-1414

Hulme JS, Higgins E, Shields R (1992) An efficient genotype independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. Plant Cell Tissue Organ Cult 31: 161-167

Jakab G, Droz E, Brigneti G, Baulcombe D, Malnoë P (1997) Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. J Gen Virol 78: 3141-3145

Jefferson RA (1989) The GUS reporter gene system. Nature 342: 837-838

Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. Mol Plant Microbe Interact 16: 777-784

Jia H, Pang Y, Chen X, Fang R (2006) Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a Tobacco Mosaic Virus vector through agroinfection. Transgenic Res 15: 375-384

Johansen E (1996) Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in Escherichia coli while biological activity is reestablished after transcription in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 93: 12400-12405

Józsa R, Balázs E (2000) Víruseredetű köpenyfehérje gének által közvetített rezisztencia transzgénikus növényekben I. (Helyzetkép az ezredfordulón). Növénytermelés 49: 165-184

Kakimoto T (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. Plant Cell Physiol 42: 677-685

Kasschau K, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman E, Krizan K, Carrington JC (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. Dev Cell 4: 205-217

Kilby NJ, Davies GJ, Snaith MR, Murray JAH (1995) Flp recombinase in transgenic plants - constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in Arabidopsis. Plant J 8: 637-652

Klein PG, Klein RR, Rodríguez-Cerezo E, Hunt AG, Shaw JG (1994) Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. Virology 204: 759-69

Kollár A, Thole V, Dalmay T, Salamon P, Balázs E (1993) Efficient pathogen-derived resistance induced by integrated potato virus Y coat protein gene in tobacco. Biochimie 75: 623-629

Komari T, Hiei, Saito Y, Murai N, Kumashiro T (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free of selection markers. Plant J 10: 165-174

Kondrák M, van der Meer IM, Bánfalvi Z (2006) Generation of marker- and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border agrobacterium transformation vector. Transgenic Res 15: 729-37

Krause-Sakate R, Redondo E, Richard-Forget F, Jadão AS, Houvenaghel MC, German-Retana S, Pavan MA, Candresse T, Zerbini FM, Le Gall O (2005) Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a Lettuce mosaic virus (LMV) isolate in some lettuce cultivars. Virus Res 109: 175-180

Kunkel T, Niu QW, Chan YS, Chua NH. (1999) Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. Nat Biotechnol 17: 916-9

Kunze I, Ebneth M, Heim U, Geiger M, Sonnewald U, Herbers K (2001) 2-Deoxy-glucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. Mol Breed 7: 221-227

Laín S, Riechmann JL, García JA (1990) RNA helicase - a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. Nucleic Acids Res 18: 7003-7006

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, López-Moya JJ, Burgyán J (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. EMBO J 25: 2768-2780

Lakatos L, Szittya Gy, Silhavy D, J Burgyán (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. EMBO J 23: 876-884

Langenberg WG, Zhang L (1997) Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. J Struct Biol 118: 243-247

Lawson C, Kaniewski W, Haley L, Rozman R, Newell C, Sanders P, Tumer NE (1990) Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. Bio/technology 8: 127-34

López-Moya JJ, Pirone TP. (1998) Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. J Gen Virol 79: 161-165

Lorenzen J, Nolte P, Martin D, Pasche JS, Gudmestad NC (2008) NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y. Arch Virol 153: 517-25

Lorenzen JH, Meacham T, Berger PH, Shiel PJ, Crosslin JM, Hamm PB, Kopp H (2006) Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. Arch Virol 151: 1055-1074

Maia IG, Haenni A-L, Bernardi F (1996) Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. J Gen Virol 77: 1335-1341

Malnoë P, Farinelli L, Collet G, Reust W (1994) Small-scale field tests with transgenic potato, cv. Bintje, to test the resistance to primary and secondary infections with potato virus Y. Plant Mol Biol 25: 963-975

Martin MT, Gelie B (1997) Non-structural potyvirus proteins detected by immunogold labelling. Eur J Plant Pathol 103: 427-431

Masuta C, Nishimura M, Morishita H, Hataya T (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of Potato virus Y correlates with resistance breaking in 'Virgin A mutant' tobacco. Phytopathology 89: 118-123

Matzke MA, Matzke AJ (2004) Planting the seeds of a new paradigm. PLoS Biol 2: E133 DOI:10.1371/journal.pbio.0020133

McKinney HH (1929) Mosaic disease in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. J Agric Res 39: 557-558

Mello CC, Conte Jr D (2004) Revealing the world of RNA interference. Nature 431: 338-342

Menzel W, Jelkmann W, Maiss E (2002) Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J Virol Methods 99: 81-92

Merits A, Guo D, Saarma M (1998) VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. J Gen Virol 79: 3123-3127

Mihálka V, Balázs E, Nagy I (2003) Binary transformation systems based on 'shooter' mutants of Agrobacterium tumefaciens: a simple, efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. Plant Cell Rep 21: 778-784

Mihálka V, Fári M, Szász A, Balázs E, Nagy I (2000) Optimised protocols for efficient plant regeneration and gene transfer in pepper (Capsicum annuum L.). J Plant Biotech 2: 143-149

Missiou A, Kalantidis K, Boutla A, Tzortzakaki S, Tabler M, Tsagris M (2004) Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. Mol Breeding 14: 185-187

Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brigneti, G, Baulcombe DC (1995) Homology-dependent resistance, transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. Plant J 7: 1001-1013

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

Newell CA, Rozman R, Hinchee MA, Lawson EC, Haley L, Sanderson P, Kaniewski W, Tumer NE, Horsch RB, Fraley RT (1991) Agrobacterium-mediated transformation of Solanum tuberosum L. cv. 'Russet Burbank'. Plant Cell Rep 10: 30-34

Nie X, Singh RP (2002) Probable geographical grouping of PVYN and PVYNTN based on sequence variation in P1 and 5′-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVYNTN. J Virol Methods 103: 145-156

Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A, Ohshima K (2008) Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. Virus Res 131: 199-212

Okamoto D, Nielsen SVS, Albrechtsen M, Borkhardt B (1996) General resistance against potato virus Y introduced into a commercial potato cultivar by genetic transformation with PVYN coat protein gene. Potato Res 39: 271-282

Onouchi H, Nishihama R, Kudo M, Machida Y, Machida C (1995) Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from Zygosaccharomyces rouxii in Arabidopsis thaliana. Mol Gen Genet 247: 653-660

Ow DW, DE Wet JR, Helinski DR, Howell SH, Wood KV, Deluca M. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science 234: 856-859

Paalme V, Gammelgård E, Järvekülg L, Valkonen JPT (2004) In vitro recombinants of two nearly identical potyviral isolates express novel virulence and symptom phenotypes in plants. J Gen Virol 85: 739-747

Palkovics L, Wittner A, Balázs E (1995) Pathogen-derived resistance induced by integrating the plum pox virus coat protein gene into plants of Nicotiana benthamiana. Acta Horticulturae 386: 311-317

Permingeat HR, Alvarez ML, Cervigni GD, Ravizzini RA, Vallejos RH (2003) Stable wheat transformation obtained without selectable markers. Plant Mol Biol 52: 415-419

Powell-Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 738-743

Puchta H (2003) Marker-free transgenic plants. Plant Cell Tissue Organ Cult 74: 123-134

Puustinen P, Rajamäki ML, Ivanov KI, Valkonen JP, Mäkinen K (2002) Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. J Virol 76: 12703-12711

Qu F, Ren T, Morris TJ. (2003) The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. J Virol 77: 511-22

Ramessar K, Peremarti A, Gómez-Galera S, Naqvi S, Moralejo M, Muñoz P, Capell T, Christou P (2007) Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. Transgenic Res 16: 261-280

Restrepo MA, Freed DD, Carrington JC (1990) Nuclear transport of plant potyviral proteins. Plant Cell 2: 987-998

Restrepo-Hartwig MA, Carrington JC (1994) The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. J Virol 68: 2388-2397

Revers F, Le Gall O, Candresse T, Le Romancer M, Dunez J (1996) Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. J Gen Virol 77: 1953-1965

Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. J Gen Virol 73: 1-16

Risseeuw E, Franke-van Dijk ME, Hooykaas PJ (1997) Gene targeting and instability of Agrobacterium T-DNA loci in the plant genome. Plant J 11: 717-728

Roberts IM, Wang D, Findlay K, Maule AJ (1998) Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. Virology 245: 173-181

Rod J, Hluchý M, Zavadil K, Prásil J, Somssich I, Zacharda M (2005) A zöldségfélék betegségei és kártevői. Viribus Unitis kiadó

Rodriguez-Cerezo E, Klein PG, Shaw JG (1991) A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. Proc Nati Acad Sci USA 88: 9863-9867

Romano A, Raemakers K, Bernardi J, Visser R, Mooibroek H (2003) Transgene organisation in potato after particle bombardment-mediated (co-)transformation using plasmids and gene cassettes. Transgenic Res 12: 461-473

Rommens MC, Humara MJ, Ye J, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K (2004) Crop improvement through modification of the plant's own genome. Plant Physiol 135: 421-431

Sáenz P, Cervera MT, Dallot S, Quiot L, Quiot JB, Riechmann JL, García JA (2000) Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K(1). J Gen Virol 81: 557-566

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory)

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997a) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. EMBO J 16: 4049-4059

Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC (1997b) VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long distance movement. J Virol 71: 8624-8631

Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KTB, Mendes O, Rouwendal GJA (2004) Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. Plant Biotech J 2: 233-240

Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewska J (2007) Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. J Virol Meth 140: 66-74

Sharp PJ, Kreis M, Shewry PR, Gale MD (1988) Location of beta-amylase sequences in wheat and its relatives. Theor Appl Genet 75: 286-290

Sheerman S, Bevan MW (1988) A rapid transformation method for Solanum tuberosum using binary Agrobacterium tumefaciens vectors. Plant Cell Rep 7: 13-16

Shukla DD, Frenkel MJ, Ward CW (1991) Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. Can J Plant Pathol 13: 178-191

Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) The Potyviridae. CABI, University Press, Cambridge UK

Simon-Buela L, Guo HS, Garcia JA (1997) Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. Virology 233: 157-162

Singh RP, Valkonen JP, Gray SM, Boonham N, Jones RA, Kerlan C, Schubert J (2008) Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato. Arch Virol 153: 1-13

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp Soc Exp Biol 11: 118–131

Smigocki AC, Owens LD (1988) Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 85: 5131-5135

Smith HA, Powers H, Swaney S, Brown C, Dougherty WG (1995) Transgenic potato virus Y resistance in potato: Evidence for an RNA-mediated cellular response. Phytopathol 85: 864-870

Smith KM (1931) Composite nature of certain potato viruses of the necrotic group. Nature 127: 702

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000) Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. Nature 407: 319-320

Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001a) A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. Heredity 86: 8-16

Solomon-Blackburn RM, Barker H (2001b) Breeding virus resistant potatoes (Solanum tuberosum): a review of traditional and molecular approaches. Heredity 86: 17-35

Souza Júnior MT, Gonsalves D (2005) Sequence similarity between the viral cp gene and the transgene in transgenic papayas. Pesqui Agropecu Bras 40: 479-486

Spetz C, Valkonen JP (2004) Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. Mol Plant Microbe Interact 17: 502-10

Srivastava V, Vasil V, Vasil IK (1996) Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (Triticum aestivum L.). Theor Appl Genet 92: 1031-1037

Stark DM, Beachy RN (1989) Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for a broad spectrum resistance. Bio/Technology 7: 1257-1262

Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H (1999) Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. Plant Cell Rep 18: 941-947

Tacahashi Y, Uyeda I (1999) Restoration of the 39 end of potyvirus RNA derived from poly(A)-deficient infectious cDNA clones. Virology 265: 147-152

Tacke E, Salamini F, Rohde W (1996) Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. Nat Biotechnol 14: 1597-1601

Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem 276: 26405-26410

Thole V, Dalmay T, Burgyan J, Balazs E (1993) Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. Gene 123: 149-156

Thomas E, Bright SWJ, Franklin J, Lancaster VA, Miflin BJ, Gibson R (1982) Variation amongst protoplast-derived potato plants (Solanum tuberosum cv. 'Maris Bard'). Theor Appl Genet 62: 65-68

Tribodet M, Glais L, Kerlan C, Jacquot E (2005) Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected Nicotiana tabacum cv. Xanthi. J Gen Virol 86: 2101-2105

Ullah Z, Groumet R (2002) Localization of Zucchini yellow mosaic virus to the veinal regions and role of viral coat protein in veinal chlorosis conditioned by the zym potyvirus resistance locus in cucumber. Physiol Mol Plant Pathol 60: 79-89

Van der Vlugt RA, Prins M, Goldbach R (1993) Complex formation determines the activity of ribozymes directed against potato virus YN genomic RNA sequences. Virus Res 27: 185-200

Vance VB, Moore D, Turpen TH, Bracker A, Hollowell VC (1992) The complete nucleotide sequence of pepper mottle virus genomic RNA: comparison of the encoded polyprotein with those of other sequenced potyviruses. Virology 191: 19-30

Varrelmann M, Maiss E, Pilot R, Palkovics L (2007) Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing. J Gen Virol 88: 1005-1015

Varrelmann M, Palkovics L, Maiss E (2000) Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of Plum pox virus. J Virol 74: 7462-7469

Velásquez AC, Mihovilovich E, Bonierbale M (2007) Genetic characterization and mapping of major gene resistance to potato leafroll virus in Solanum tuberosum ssp. andigena. Theor Appl Genet 114: 1051-1058

Verchot J, Carrington JC (1995) Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. J Virol 69: 3668-3674

Visser RGF, Jacobsen E, Heseeling-Meinders A, Shans MJ, Witholt B, Feenstra WJ (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an Agrobacterium tumefaciens binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. Plant Mol Biol 12: 329-337

Voinnet O (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. Trends Genet 17: 449-459

Waites R, Simon R (2000) Signaling cell fate in plant meristems. Three clubs on one tousle. Cell 103: 835-838

Ward CW, Shukla DD (1991) Taxonomy of potyviruses: Current problems and some solutions. Intervirology 32: 269-296

Waterhouse PM, Graham MW, Wang M-B (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc Natl Acad Sci USA 95: 13959-13964

Weigel D, Glazebrook J (2002) Arabidopsis: A Laboratory Manual (pp. 165-166) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Wenck A, Czako M, Kanevski I, Marton L (1997) Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation. Plant Mol Biol 34: 913-922

Wenzler H, Mignery G, May G, Park W (1989) A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. Plant Sci 63: 79-85

Yambao ML, Yagihashi H, Sekiguchi H, Sekiguchi T, Sasaki T, Sato M, Atsumi G, Tacahashi Y, Nakahara KS, Uyeda I (2008) Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. Arch Virol 153: 105-115

Yang XC, Yie Y, Zhu F, Liu Y, Kang LY, Wang XF et al. (1997) Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4861-4865

Zuo J, Niu Q-W, Chua N-H (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J 24: 265-273

Zuo J, Niu QW, Ikeda Y, Chua N-H (2002) Marker-free trans formation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. Curr Opin Biotechnol 13: 173-180