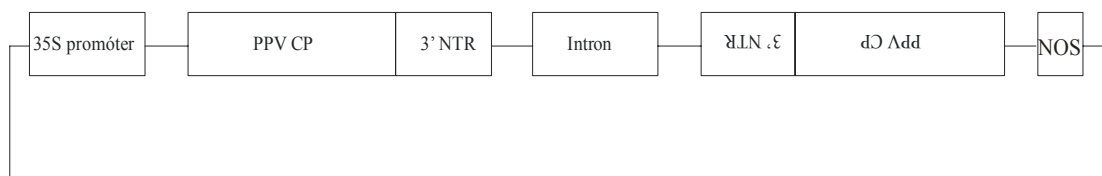


Korábbi kísérleteink során a szilva himlő vírus (PPV) köpenyfehérje (CP) génjével és 3' nem kódoló régióval sikeresen transzformáltunk növényeket, melyek rezisztensek voltak a felülfertőző vírussal szemben. Az irodalmi adatok alapján a géncsendesítés alapú rezisztencia akkor volt a leghatékonyabb, ha a konstrukcióban a gén ún. inverted repeat formában, vagyis egymást követően szenz és antiszenz formában is jelen volt, köztük pedig egy kitöltő, ún. spacer szekvencia helyezkedett el, amely egy rövid intron szekvencia. Elkészítettük a konstrukciót (1. ábra).



1. ábra Az intront tartalmazó génkonstrukció felépítése.

A konstrukció tartalmazza a karfiol mozaik vírus 35S promóterét, a NOS terminációs szignált, és e két szabályozó régió között a hasznos gént, vagyis a szilva himlő vírus köpenyfehérje génjét és a 3' nem kódoló régióját (3' NTR) inverted repeat formában, köztük pedig a *Solanum tuberosum* IV/ST-LS1 189 bázispár (bp) hosszú intronját. A transzgen és felülfertőző vírus közti esetleges rekombinációt elkerülendő a konstrukció nem tartalmazta a 3' nem kódoló régió legvégét, amit a vírus polimeráza felismer a replikáció során. A köpenyfehérje gén szekvenciáját úgy illesztettük a konstrukcióba, hogy fehérjetermék ne keletkezzen róla, valamint nem tartalmazta a gén 5' végét, ami a levéltetűvel való átvitelért felelős. A kész konstrukciót bejuttattuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, majd ennek segítségével transzformáltunk kísérleti dohánynövényeket. A transzformáció során 14 növényi vonalat neveltünk fel, mely a hasznos génen kívül tartalmazta a kanamicin markergént. A 14 vonalból csak 3 vonalat találtunk transzgenikusnak a PCR tesztelés során. A három vonal utódnemzedékéből ötöt vizsgáltunk a szilva himlő vírus elleni rezisztenciára valamint a transzgen hasadására. Összesen 1 vonalról sikerült bizonyítani, hogy nem hasadó és egyben rezisztens a felülfertőző vírusra. A hasadási teszteknel az utódnemzedék magjaiból ötvenet helyeztünk kanamicint tartalmazó táptalajra, és csak azzal dolgoztunk tovább melyből 100%-os arányban tudtunk növényeket felnevelni. Célkitűzés volt, hogy az EU elvárásoknak megfelelően markermentes, tehát antibiotikum rezisztencia gént nem tartalmazó konstrukcióval is hozzunk létre transzgenikus dohányokat. Ebben az esetben a transzformáció után nincs lehetőség szelekcióra, a növények transzgenikus voltát csak PCR teszt segítségével lehet megállapítani. Ez azt jelenti, hogy sokkal nagyobb vonalszámot kell előállítani, hiszen a regeneráció során a nem transzgenikus regeneránsok is megjelennek, sőt nagyságrendekkel nagyobb gyakorisággal, mint a transzgenikus növények, mert a transzformáció hatékonysága lényegesen alacsonyabb, mint a regenerációé.

A kanamicin mentes konstrukcióval való transzformálás után először 27 vonalat neveltünk fel, később különböző transzformációkból összesen 450 vonalat neveltünk fel. Ezeket a vonalakat 5-ös poolokban teszteltük PCR segítségével. Azokból az ötös csoportokból, melyek pozitív eredményt adtak, elvégeztük az egyedi teszteket. Az összesen 477 vonalból 15 mutatott pozitív eredményt PCR-rel, vagyis ezek voltak transzgenikusak a szilva himlő vírus köpenyfehérje génjére. Ezen vonalak utódnemzedéknek előállításához, a hasadás megállapításához a magot fogtunk. További vizsgálatok azt mutatták, hogy a 15 egyedből csupán egy tartotta meg transzgenikus tulajdonságát a fenntartások során. Ennek az egy vonalnak a felszaporítását, utódnemzedékének hasadási tulajdonságait, és rezisztenciáját

teszteltük. A magfogásból 29 növényt neveltünk fel ebből 20 növény rezisztens lett 9 pedig fogékony (2. ábra)



2. ábra Transzgenikus fogékony (bal oldal) és a transzgenikus rezisztens (jobb oldal) *Nicotiana benthamiana* növények három héttel a vírusinokuláció után.

Az eredmények alapján jól megfigyelhető, hogy egy viszonylag könnyen transzformálható növényfaj transzformáción átesett és szelekció nélkül felnevelt közel ötszáz egyedéből, csak egy mutatott sikeres transzformációt, a transzgén stabil beépülését. Ez előre vetíti, hogy egy nehezen transzformálható fás, csonthéjas növény transzformációs kísérletei során milyen hatékonysággal van esély transzgenikus egyedek előállítására, ahol a transzformáció után nincs lehetőség előszelekcióra.

Azokból a növényekből melyek transzgenikusak voltak és tartalmazták a kanamicin gént az oltási kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a transzgenikus és vírusrezisztens növények alanyként használva indukálnak-e rezisztenciát a transzgenikus, de nem rezisztens nemesben, illetve a nem transzgenikus nemesben.

Az első oltási kísérletben felhasznált növények a következők voltak:

Oltási alanyok: 23/3 vonal transzgenikus, rezisztens 12/14 vonal transzgenikus, fertőzhető nem transzgenikus *Nicotiana benthamiana*.

Oltás típusok: 13/3 és 12/14 egymással, felváltva alanyként és oltótként (két variáns) 13/3 és nem transzgenikus, felváltva alanyként és oltótként (két variáns) 12/14 és nem transzgenikus, felváltva alanyként és oltótként (két variáns).

Fertőzés: Minden variánst még két csoportra bontottunk, és fertőztük PPV-vel az oltás alatt és felett, így 12 növény típust vizsgáltunk.

A PPV-vel való inokulálás után két héttől kezdődően hetente, hat héten át vizsgáltuk a növényeket 6-7 ismétlésben, kivéve a fogékony alany és nemes kombinációkat, ahol 4 ismétlésben végeztük a kísérleteket. Így összesen hetven oltott növényegyet tesztelünk.

A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy minden olyan kombinációban, ahol a nem transzgenikus részt, vagy a nem rezisztens transzgenikus részt inokuláltuk ezek a növényi részek fertőződtek és a transzgenikus rezisztens rész sem alanyként, sem nemesként nem tudta

biztosítani a rezisztenciát a nem rezisztens részeknek. Amennyiben a rezisztens részt mind alanyként mind nemesként inokuláltuk, ahogy elvárható volt a növények ezen részei sem, és az oltvány nem rezisztens részei sem fertőződtek 22 vizsgált esetben. Ez alól csak 5 esetben találtunk kivételt, amikor a rezisztens részt inokulálva a nem rezisztens részekben megjelentek a vírus tipikus tünetei. Ez a vizsgált rezisztens, nem rezisztens kombinációkra lebontva típusonként egy-egy előfordulást jelentett.

Két kombinációnál, ahol az alany a rezisztens transzgenikus rész volt a nemes pedig nem transzgenikus és transzgenikus fogékony részek voltak, és az első transzgenikus rezisztens részen történő inokulálás után a nemes részen nem jelentkeztek tünetek az elvártaknak megfelelően a növényeket az első inokulálást követően 1 hónappal újra inokuláltuk. Az inokulálást azonban most nem a rezisztens részen, hanem a fogékony részen végeztük el, annak tesztelésére, hogy az első inokulálás a rezisztens részen indukált-e rezisztenciát a fogékony részekben. Azt találtuk, hogy a fogékony részek minden esetben fertőződtek. Így a dohánykísérletek alapján az a következtetés vonható le, hogy az oltványoknál a transzgenikus rezisztens rész nem képes a teljes növény védelmét biztosítani a vírus ellen.

A kísérleteket olyan irányban folytattuk tovább, hogy vajon a szilva himlő vírusra rezisztens növényt fertőzve más vírusokkal a növény továbbra is megtartja a rezisztencia tulajdonságát a PPV-re vagy sem. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a transzgenikus növényekben a rezisztenciát biztosító gene silencing mechanizmus, más vírus fertőzése által kikapcsolható, szupresszálható, így a korábban egy adott vírusra rezisztens növény fogékonná válik. Ez azzal magyarázható, hogy ebben az esetben a felülfertőző vírusok fehérjéi, melyek gén csendesítés szupresszálló aktivitással rendelkeznek, blokkolják a növény természetes védekező mechanizmusát, amely eddig működött az ellen a vírus ellen, amelyre transzgenikus volt a növény. Ez a természet szemponyjából fontos kérdés, mert ha egy rezisztens növényt más vírus felülfertőz, és így a növény elvesztheti rezisztenciáját, akkor mit sem ér a transzgenikus úton kialakított rezisztencia. A kísérleteket megkezdtük, a rezisztens növényeket a PPV-n kívül a burgonya Y vírussal (Potato virus Y, PVY), a paprika érfoltosság vírussal (Pepper vein mottle virus, PVMV), az uborka mozaik vírussal (Cucumber mosaic virus, CMV) és a burgonya X vírussal (Potato virus X, PVX) fertőztük felül. A PVY a PVMV a PPV-vel együtt a potyvírusokhoz tartozik, melyek gén csendesítés szupresszora a helper komponens vírusfehérje, a CMV a cucumovírusokhoz tartozik, szupresszoruk pedig a 2b fehérje.

Az oltási kísérletekben 4 féle növényt használtunk:

1. Transzgenikus PPV fogékony alany és transzgenikus PPV rezisztens nemes
2. Transzgenikus PPV rezisztens alany és transzgenikus PPV fogékony nemes (az előző fordítottja)
3. Nem transzgenikus (fogékony) alany és transzgenikus PPV rezisztens nemes
4. Transzgenikus PPV rezisztens alany és nem transzgenikus (fogékony) nemes (az előző fordítottja)

Mind a négy típusnál a fertőzhető részt PPV-vel inokulálva, majd később a különböző vírusokkal felülfertőzve a rezisztens részek továbbra is megőrizték PPV rezisztenciájukat. A nem rezisztens részt vizsgálva minden esetben ki tudtuk mutatni a PPV mellett a különböző felülfertőző vírusokat.

A konklúzió az a kísérleti eredmények alapján, hogy egy rezisztens növény, ha más vírus felülfertőz, akkor sem fogja elveszíteni az adott vírusra a rezisztenciáját. Ez nemesítési és

termesztési szempontból nagyon fontos kérdés, mert sok esetben a növényeket nem egyféle vírus fertőzheti meg a természető berendezésben ill. a szabadföldön.

A szilva transzformációs kísérletekben levélgyelet (3. ábra) és sziklevelekkel (4. ábra) dolgoztunk. Levélgyelet esetén 3 konstrukciót használtunk:

1. PPV köpenyfehérje (CP) gén + kanamicin rezisztencia gén + GUS gén.



Ebben az esetben 8 transzformációból összesen 20 független transzformánst neveltünk fel ebből a fele az első vizsgálatuk alapján transzgénikusnak bizonyult a PPV CP génre, ugyanakkor negatívak voltak GUS festésre. A második vizsgálatban, ezen növények vegetatív továbbszaporítása után már negatívak voltak a CP génre.

2. PPV köpenyfehérje (CP) gén kétféle orientációban (inverted repeat + intron) markermentes.



Ebben az esetben 2 transzformációból 2 vonalat tudunk felnevelni melyek a transzgénre PCR vizsgálattal negatívak voltak.

3. PPV köpenyfehérje (CP) gén kétféle orientációban (inverted repeat + intron) + kanamicin markergén.



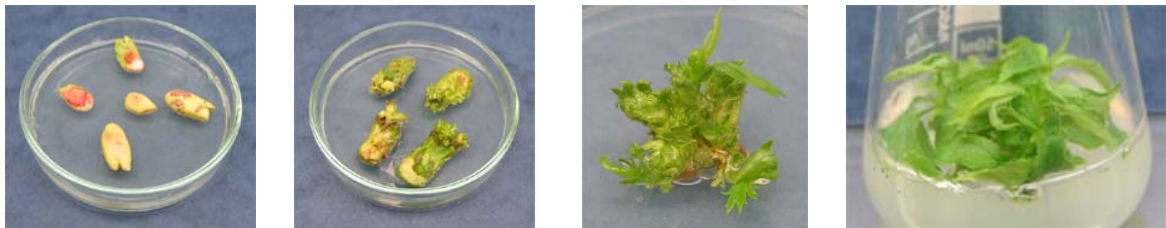
A 9 transzformációból származó 42 független transzformánsból PCR-rel 39 negatív volt ill. 3 pozitív, az első vizsgálatkor. A második vizsgálatnál a korábban 3 pozitív vonal negatív eredményt mutatott.



3. ábra A levélgyelet transzformáció és regeneráció lépései

Sziklevél transzformáció esetén két konstrukciót használtunk:

1. PPV köpenyfehérje (CP) gén kétféle orientációban (inverted repeat) + GUS gén + kanamicin rezisztencia gén. Egy transzformációból 16 sziklevélen 81 független transzformációból született hajtást neveltünk fel, ebből PCR-rel 70 negatív és 11 pozitív volt illetve GUS festéssel mind a 81 negatív volt az első vizsgálatkor. A második analízis során a 11 PCR pozitív negatív eredményt adott.
2. PPV köpenyfehérje (CP) gén kétféle orientációban (inverted repeat) + kanamicin markergén. Kilenc transzformációból 288 hajtást neveltünk fel 70 sziklevélből, ezekből az első PCR-es vizsgálat során 57 bizonyult pozitívnak.



4. ábra A sziklevél transzformáció és regeneráció lépései

A rutintesztelek során, amikor különböző helyekről származó fertőzött szilvákat vizsgáltunk PCR technikával, felfigyeltünk egy olyan izolátumra (B1298), mely rövidebb PCR terméket adott a vártnál. Lágyszárú tesztnövényekből össznukleinsav kivonást végeztünk, amit reverz transzkripció, majd PCR követett. A PCR terméket klónoztuk és nukleinsav sorrendjét meghatároztuk.

A köpenyfehérje gén vizsgálatokor 135 nukleotid hosszúságú (45 aminosav) deléciót mutattunk ki a gén 5' végén. A PPV köpenyfehérjében lévő delécióra ez idáig csak három másik példa (PPV-NAT, PPV-SH, PPV-KAZ) ismert, de nem ilyen nagymértékű, csak 15, 14 ill. 2 aminosavas deléciók (5. ábra).

```

NAT  ADEREDEEEVDA-----LQPPPVIQAPRRTTAPMLNPIFTPATTQPATKPVSVQVSGPQLQTFGTYSHEDASPSNSNALVNTNR
SH   ADEREDEEEVDA-----ILQPPPVIQAPRRTTAPMFNPIFTPATTQPATKPVSVQVSGPQLQTFGTYGNEDASPSNSNALVNTNR
KAZ  ADEREDEEEVDAGKPIVVTAPAATSPILQ--PVIQAPRRTTAPMFNPIFTPATTQPATKPVSVQVSGPQLQTFGTYGNEDASPSNSNALVNTNR
B1298 ADEKEDDEEVDAGKPPVVTAPAATVATTQPAPVIQPAIQTTT-----LVNTGR
BT-H  ADEKEDDEEVDAGKPTVVTAPAATVATTQPAPVIQPAIQTTTTFMFNPIFTPATTQPAIRPVSPISGATPQSFVGYGNEDASPSNTLVNTGR

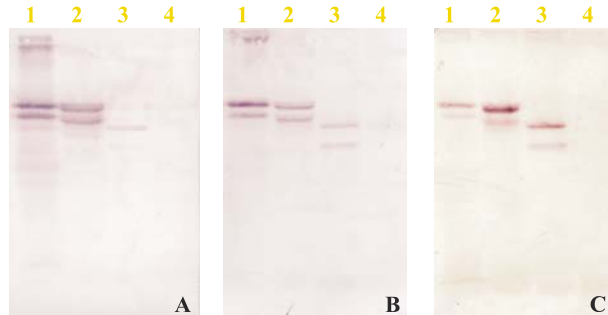
```

5. ábra A delécióval rendelkező izolátumok CP amino-terminális részének összehasonlítása, a delécióval nem rendelkező BT-H magyar kökény izolátummal.

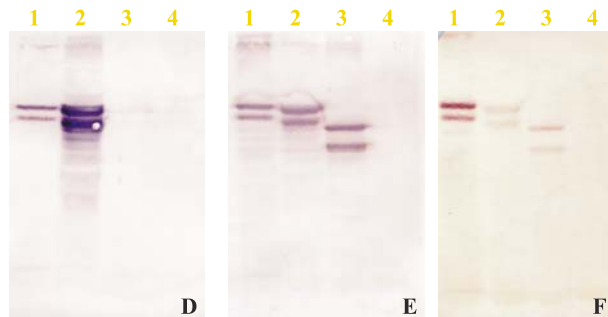
Annak tisztázására, hogy nem PCR műtermékről van szó, ezt a rövidebb köpenyfehérje gént tartalmazó szakaszt beépítettük a korábban elkészített SK-68 vírus izolátum fertőzőképes klónjába. A köpenyfehérje csere nem volt hatással a vírus létfontosságú életfolyamataira. A B1298 izolátumban a mutáció nem érintette a levéltetűvel való átvihetőségért felelős DAG aminosav motívumot, a mutáció ez után helyezkedett el a genomon és levéltetű átviteli kísérletek is pozitívak voltak. Számítógépes analízis segítségével elkészítettük a B1298 izolátum CP-jének feltételezett harmadlagos szerkezetét. A mutáció nem eredményezett strukturális változást a fehérje szerkezetében.

A B1298 izolátum kimutathatóságát különböző kereskedelmi forgalomban található poli- és monoklonális antitestekkel teszteltük. A felhasznált antitestektől függően eltérő eredményeket kaptunk, bizonyos antitestek esetében az izolátum rossz hatékonysággal, vagy egyáltalán nem volt kimutatható western blot segítségével (6. ábra). Ugyanakkor bizonyítottuk, ezt az

izolátumot is beleértve, hogy Európában az úgynevezett rekombináns izolátumok földrajzi elhelyezkedéstől függetlenül széles körben elterjedtek. Ezek az izolátumok a két fő szerológiai módszerekkel felállított M és D típusok közötti rekombinánsak. A rekombinációs pont a köpenyfehérje előtt az Nib génben található, de ez a rekombinációs esemény a köpenyfehérje néhány aminosavának megváltozásával is járt.



- A. Real Durviz PPV specifikus antitest
- B. DSMZ PPV (AS-0019) antitest
- C. Bioreba AP konjugált antitest
- D. Real Durviz PPV M specifikus (A1) antitest
- E. Real Durviz PPV specifikus (5B) antitest
- F. Sanofi PPV M+D specifikus AP konjugált antitest

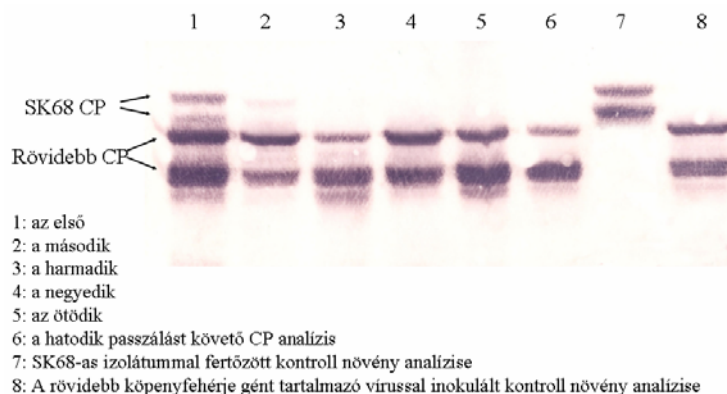


- A-C poliklón antitestek
- D-E monoklón antitestek

1. SK68 fertőzőképes klón
2. Pd4 PPV izolátum
3. Fertőzőképes klón, mely tartalmazza a B1298 izolátum CP régióját
4. Egészséges növényi kivonat

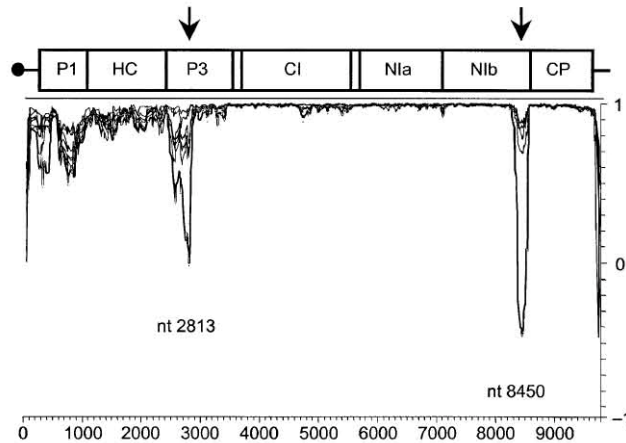
6. ábra Különböző klónok és izolátumok kimutathatóságának vizsgálata eltérő antitestek esetén Western blottal.

Megvizsgáltuk a delécióval rendelkező izolátumot kompetíciós kísérletben, hogy vajon rendelkezik-e előnnyel a delécióval nem rendelkező vírussal szemben. Együttfertőzés után 2-3 héttel új, egészséges növényekre passzáztunk. Az eredmények azt mutatták, hogy a delécióval nem rendelkező klónból származó vírus mennyisége a második passzálást követően a detektálási határ alá esett és már csak a deléciós köpenyfehérjét tartalmazó klón volt nagy mennyiségben kimutatható Western blottal (7. ábra).



7. ábra Kompetíciós kísérlet

Nemzetközi együttműködésben vizsgáltunk számos európai PPV izolátumot, eredményeink azt mutatják, hogy az izolátumok között számos rekombináns volt a D és M típus között. Meghatároztuk a rekombinációs pont helyét az N1b génben, mely minden esetben ugyanazon helyen történt. Azonosítottunk ugyanakkor egy másik rekombinációs pontot is a P3 génben (8. ábra).



8. ábra Egy rekombináns izolátum filogenetikai összehasonlítása az összes elérhető teljes PPV szekvenciákkal.

Az ábra grafikusán mutatja a filogenetikai kapcsolatot a teljes genomra vetítve. Az ábra tetején a genomszerveződés látható, az alján pedig a genom hossza (x tengely), mely mutatja a filogenetikai inhomogén helyeket (2813, 8450 nt). Az eltérések (y tengely) vizsgálata filogenetikai távolság számítás alapján történt 40 bázisonként végig a genom teljes hosszán. A nyíl a rekombináció helyeit mutatja.

Ezek az eredmények felhívják a figyelmet a vírusok változékonyságára, evolúciójára és egyben a detektálási módszerek folyamatos frissítésének szükségességére. A köpenyfehérje gén változékonyságának vizsgálata fontos a hatékony vírusrezisztencia kialakításában.