

Vírusrezisztencia indukálása árpában

Kis András¹; Eitel Gabriella¹; Ivanics Milán¹; Bán Rita²; Jenes Barnabás¹; Havelda Zoltán¹

¹Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

²SZIE, Növényvédelmi Intézet, Gödöllő

A hazánkban termesztett gabonafajok közül a harmadik legfontosabb növényünk az árpa. Jelentős a söripari és az abraktakarmánynak történő felhasználása is. Az őszi árpát a gabonaféléket károsító vírusbetegségek közül a Búza törpülés vírus (WDV - Wheat Dwarf Virus) fertőzi a leggyakrabban, mely egyúttal jelentős termésvesztést és minőségi károsodást is okoz. A vírus kizárólagos vektora a Csíkos gabonakabóca (Psammotettix alienus Dhalb.), amely perzisztens módon terjeszti a kórokozót. A vírus leküzdésére mindeztől nem állnak rendelkezésre megfelelő rezisztenciát biztosító gének.

Kutatócsoportunk a vírusrezisztencia indukálására az RNS csendesítés (RNA-silencing) néven ismert technológiához fordult. Ennek létrehozásához az árpa saját miRNS géneit vettük alapul, melyeket molekuláris módszerekkel a vírusra specifikus szekvenciákkal láttunk el. A WDV vírusnak több változata ismert, melyek szekvenciái az NCBI adatbázisban rendelkezésre állnak. A vírus mutációjának elkerülése érdekében fontos, hogy a mesterséges miRNS-ek célszekvenciái átíródo és egyben konzervatív szekvenciák legyenek. Ugyanezen szempontot figyelembe véve több mesterséges miRNS (artificial miRNS- amiRNS) konstrukciót hoztunk létre melyek a transzkriptálódó vírusgenom különböző szegmenseit veszik célpontba.

A miRNS technológia egyik nagy jelentősége abban rejlik, hogy az általa létrehozott tulajdonság manifesztálódásához nincs szükség fehérjére. Tehát az így létrehozott növények nem termelnek (faj-)idegen fehérjéket, enzimeket, csupán egy 21 nukleotid hosszúságú RNS molekulát, amely a csendesíteni kívánt (vírus) gén bizonyos szegmensével komplementer. Mindezt tovább gondolva a fontosnak tartjuk, hogy az általunk – árpa miRNS génekből – előállított mesterséges miRNS konstrukciót árpa irányító szekvenciákkal (promóter, terminátor) lássuk el.

Az elkészített vektorkonstrukciót Agrobacterium-ra alapozott módszerrel juttattuk be az árpa kallusok sejtjeibe, melyekből növényt regeneráltunk.

A transzgenikus árpavonalak vírusrezisztenciára történő tesztelését WDV-t hordozó Psammotettix alienus Dhalb. imágókkal teszteljük mikroizolátorokban.

A három és fél éves kutatómunka eredményeit rövid irodalmi áttekintést követően az alábbiakban foglaltuk össze.

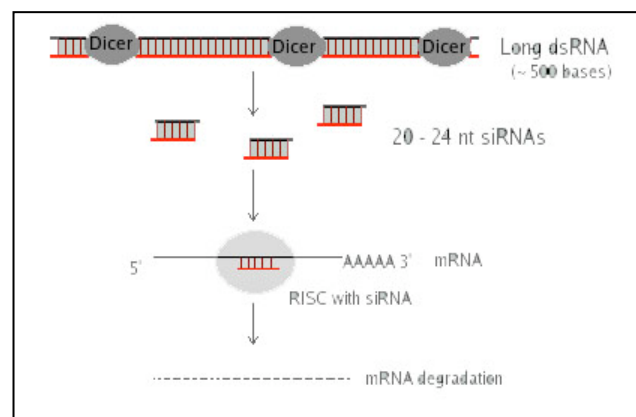
1. A kutatás irodalmi háttere, megalapozása

1.2 RNS alapú géncsendesítés

Az RNS alapú géncsendesítést indukáló kis RNS molekulák alapvetően kétféle módon jöhetnek létre. Az egyik útvonal, ha egy hosszú kettős szálú RNS molekulából alakulnak ki a 21-24 nukleotid hosszúságú, úgynevezett siRNS molekulák. A mechanizmust beindító kis RNS-ek másik csoportját a miRNS-ek képezik, melyek egy egyszálú RNS molekula másodlagos szerkezetének kialakulását követően jönnek létre.

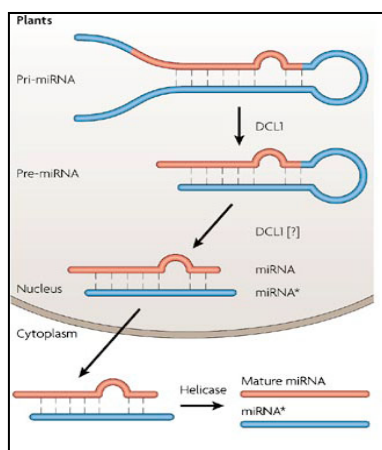
1.3 Kis interferáló RNS-ek (siRNS)

Adaptív, szekvencia specifikus RNS degradációs rendszer, amely szerepet játszik az idegen genetikai elemek (transzpozonok, vírusok, stb.) elleni védekezésben és a genom sértetlenségének megőrzésében (BAULCOMBE, 2005). A kettős szálú dsRNS molekulák kialakulhatnak spontán (komplementaritás), illetve a növényi RNS-függő RNS polimeráz (RdRP) által.



A géncsendesítési mechanizmus során a DICER elnevezésű RNáz III típusú enzim kicsi, 21-24 nukleotid hosszúságú dsRNS molekulákká, úgynevezett siRNS-ekké darabolja a hosszú, dupla szálú RNS molekulákat. A növényekben felhalmozódó siRNS-ek beépülnek az RNS interferencia végrehajtó komplexébe, a RISC-be (RNA-induced Silencing Complex), amely a siRNS-ek által specifikusan degradálja a vele homológiát mutató RNS szálakat (SILHAVY AND BURGYN, 2004).

1.4 Mikro RNS (miRNS)



Az RNS csendesítés a miRNS-ek által fontos szereplője a növényi endogén génszabályozásnak. A miRNS-ek targetjei általában mRNS-ek.

A növényi miRNS lókusztokról polyA véggel, és metilált-guanozin sapkával ellátott transzkriptumok szintetizálódnak az RNS polimeráz II enzim által, melyekről fehérje nem transzlálódik. A létrejövő pri-miRNS molekulák a sejtmagban hajtűszerű (stem-loop) struktúrát vesznek fel. A duplaszálú pri-miRNS-ek először pre-miRNS-é (prekursor) hasítódnak az RNáz III-szerű DICER enzim által, majd egy következő lépésben a DICER ~21 nukleotid nagyságú

duplaszálú miRNS-ké hasítja őket, létrehozva ezzel a miRNS-miRNS* duplexet, melyből a „csillag szál“ eliminálódik, a miRNS pedig beépül a RISC-komplexbe. A RISC-miRNS komplex felismeri a miRNS-sel komplementer RNS-eket és hozzájuk kapcsolódik. Ezzel gátolhatja az azokról történő fehérje szintézist, illetve degradálhatja azokat. A miRNS-ek célpontjai sokszor transzkripciós fehérjék mRNS-ei (BARTEL, 2004).

Mindezen ismereteket alapul véve vírusrezisztencia kialakítására a kutatók többféle módszert is kidolgoztak.

1.5 IR (Inverted Repeat)-közvetítette vírus rezisztencia (siRNS)

Ebben az esetben a transzgen olyan szekvencia elemeket tartalmaz, amelyek vírustól származó szekvenciák IR (fordítva ismétlődő szekvencia) változatai. A transzgenről létrejövő hosszú RNS molekula komplementer szekvenciái egymással hibridizálnak. A kétszálú RNS molekulát a DICER enzim 21-24nt nagyságú kétszálú RNS-ekké hasítja (siRNS), melyből az egyik szál eliminálódik. Az siRNS-ek beépülve a RISC-komplexbe hibridizálnak a velük homológiát mutató (vírus) RNS-ekkel, ami azok degradációjához vezet. Az ilyen IR transzgen (siRNS) konstrukciók felhasználásával hatékony vírusrezisztenciát érhetünk el (HELLIWEL ÉS WATERHOUSE, 2005). A módszer hátránya, hogy az IR szekvenciákkal létrehozott géncsendesítési mechanizmus eddig ismeretlen okokból hőmérséklet-függőséget mutat – 15 °C alatt csökken az aktivitása - (SZITTYA ET AL., 2003), illetve, hogy az ilyen konstrukciókról számos siRNS molekula alakul ki, amely megnöveli annak az esélyét, hogy a gazdanövényben más, nem kívánt géncsendesítési folyamatokat is megvalósítson.

1.6 Mesterséges miRNS technológia (Artificial miRNA – amiRNA, amiRNS)

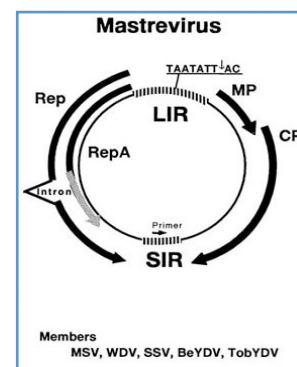
Egy másik járható út, ha egy olyan transzgen konstrukciót hozunk létre, amelyről egy ismert (a növényi génszabályozásban résztvevő) miRNS prekursor segítségével egy vírusra specifikus miRNS-t termeltetünk. A miRNS prekuzort PCR-mutagenézissel oly módon alakítjuk át, hogy az arról érő mesterséges miRNS-ek (amiRNS) a RISC-komplexbe épülve elősegítsék a vírus RNS-ek degradációját.

A módszer előnye az IR technológiával szemben, hogy a miRNS nyújtotta géncsendesítési mechanizmus nem mutat hőmérséklet-függőséget (SZITTYA ET AL., 2003). Árpaszempontjából ez a technológiai előny döntő jelentőségű, ugyanis az agresszívebb WDV fertőzés a hidegebb, őszi időszakokra tehető.

1.7 Wheat dwarf virus (Búza törpülés vírus)

A Búza törpülés vírus a *Geminiviridae* család *Mastrevirus* nemzetségének tagja.

A virion egy egytagú, egyszálú, cirkuláris DNS molekulát tartalmaz. Genomja 4 fehérjét kódol: V1 - *köpenyfehérje* (CP); V2 - *mozgási fehérje* (MP); C1 – *Rep*; C2 – *RepA*. A genomon elhelyezkedő két nem kódoló régiónak (LIR és SIR) a replikációban és az átírásban van szerepe.



2. Anyag és módszer

2.1 Vírus minták begyűjtése, vírusgenom összehasonlítás

A kompolti Fleischmann Rudolf Kutatóintézet gazdaságából begyűjtöttük a Búza Törpülés Vírus (Wheat Dwarf Virus – WDV) tüneteit mutató árpa növényeket, melyekből DNS-t vontunk ki.

A Növényvédelmi Kutató Intézetből Dr. Tóbiás István rendelkezésünkre bocsájtotta az általuk klónozott és leírt WDV-h07-es árpát fertőző vírustörzset (FM210034).

Az internetes NCBI adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) fellelhető valamennyi WDV árpa törzs szekvenciáját összehasonlítottuk átíródo konzervatív szekvenciák keresése érdekében, amiket főként a vírus *replikáz* és *mozgási fehérje* génjeiben (C1, C2, V2) találtunk meg.

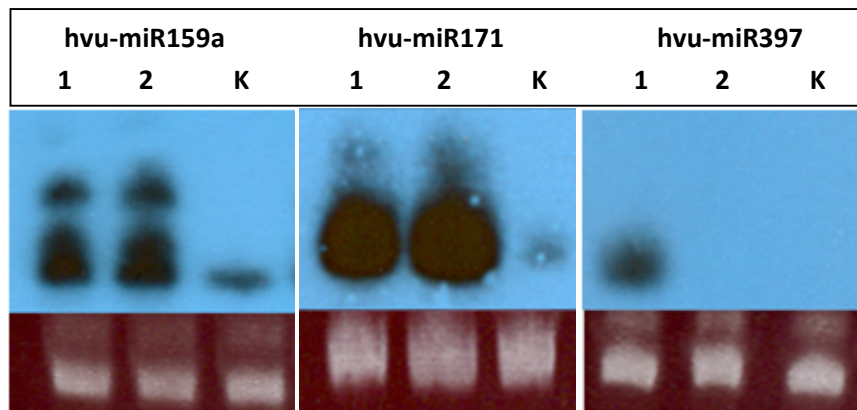
Mivel a vírus árpa törzse genom szinten igen nagy egyezést mutat a vele közeli rokon BDV (Barley dwarf virus) vírus árpa törzsével (95-99%), illetve a WDV vírus búza törzsével (83-85%) (TÓBIÁS, 2008) az összehasonlításba bevontuk ezen vírus törzsek *replikáz* és *mozgási fehérje* génjeit is.

2.2 Árpa miRNS gének felkutatása, tesztelése

Internetes miRNS adatbázisból (www.mirbase.org) kiválasztottunk három árpa miRNS prekuzort, melyeket az NCBI EST adatbázisába illesztettünk. Az így megkeresett pri-miRNS-ekre primereket terveztünk és klónoztuk azokat. A későbbi átalakítás szempontjait figyelembe véve három árpa miRNS gént (hvu-mir159a; hvu-mir171; hvu-mir397) izoláltunk.

Árpa totál RNS kivonást követően a kivonatból reverz-transzkriptáz enzim segítségével cDNS könyvtárat hoztunk létre. Amely templátul szolgált az általunk kiválasztott miRNS-ekre specifikus primerekkel végzett PCR reakcióban. A sikeresen izolált miRNS-eket *Agrobacterium*-ban is replikálódó, bináris vektorba helyeztük *CaMV* 35S promóterrel és terminátorral ellátott konstrukcióba. Agrobakteriális infiltrációval *Nicotiana benthamiana* növényekben tranziensen működtettük a kiterjesztett pre-miRNS-eket tartalmazó vektorokat. A dohány növények leveléből RNS-t vontunk ki, amit poliakril-amid gélen megfuttattunk, és membránra blottoltunk. Northern hibridizációval meggyőződünk róla, hogy a klónozott miRNS-ekről érnek-e a 21 nukleotid nagyságú miRNS-ek (1. ábra). A Northern hibridizáció eredményei pozitívnak bizonyultak, az infiltrált növények leveleiben szignifikánsan több miRNS képződött, mint a kontroll növények esetében.

További PCR reakcióval amplifikáltuk a pre-miRNS-eket, melyeket szintén bináris vektorba ligáltunk és agrobakteriális rendszerben dohány növényben teszteltünk.



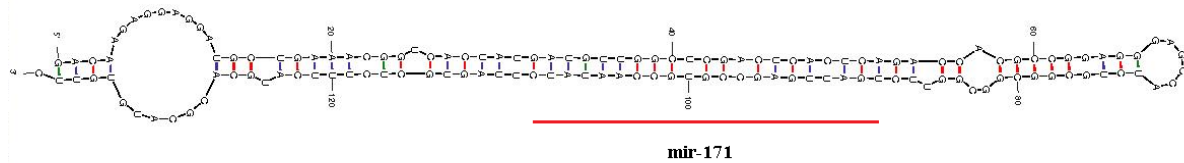
1. ábra: Kis-RNS Northern hibridizáció radioaktív próbával (1:kiterjesztett prekursor; 2: szűk prekursor; K- kontroll infiltrált növény)

A legnagyobb mértékű kis-RNS felhalmozódást a hvu-mir171-es prekursor esetében tapasztaltuk. A hvu-mir159a prekuzornál 22 és 24 nukleotidos tartományban is detektáltunk kis-RNS felhalmozódást, illetve a hvu-mir397-es esetében a szűk prekuzorról nem sikerült kis-RNS-t termeltetnünk. Mindezek alapján a továbbiakban az árpa hvu-mir171-es prekuzorát használtuk fel a kísérleteinkben.

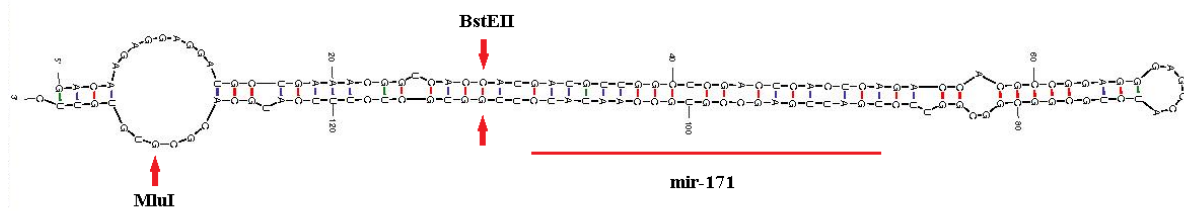
Érdeemesnek tartjuk itt megjegyezni, hogy a www.mirbase.org miRNS adatbázisban leközölt árpa hvu-mir171-es miRNS (MI0016461) szekvenciája nem egyezik teljes egészében az NCBI adatbázisban ráilleszkedő EST szekvenciával (CA009309) illetve az általunk izolált és megszekvenált szekvenciával sem. Ezért a továbbiakban a munkánkat az utóbbi, megegyező szekvenciákra alapoztuk.

2.3 Az árpa hvu-mir171-es prekuzorának mutagenezise

A prekuzoron a 21 nukleotidos miRNS és annak komplementer (csillag) szálának közelében pontmutációkat hoztunk létre, amelyekkel egyedi hasítóhelyeket (BstEII, MluI) generáltunk (2. és 3. ábra) mind a prekuzorra, mind a bináris vektorra (pC61K) tekintettel. A mutációkat úgy hoztuk létre, hogy a prekuzor másodlagos szerkezete ne változzon meg. Erre a későbbi átalakítás megkönnyítése szempontjából volt szükség, hogy minél kisebb PCR oligókkal képesek legyünk a modifikációra.

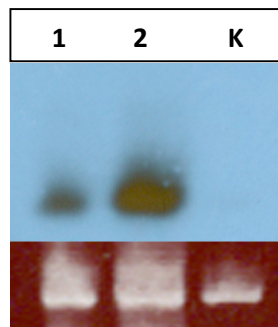


2. ábra: Az árpa hvu-mir171-es prekurzorának másodlagos szerkezete



3. ábra: Módosított hvu-mir171-es prekurzor másodlagos szerkezete (a piros nyilak a pontmutációk helyeit jelölik)

Az átalakítást követően Northern hibridizációval meggyőződünk arról, hogy a módosított prekurzorról történő miRNS felhalmozódásban nem történt-e változás (4. ábra)



4. ábra: A módosított hvu-mir171 prekurzor Northern hibridizációja (1: vad hvu-mir171; 2: módosított hvu-mir171MOD, K: kontroll infiltrált növény)

2.4 Mesterséges miRNS konstrukciók építése (amiRNS)

A vírusra specifikus amiRNS-eket egy internetes „OFF-target” kereső program (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) segítségével megvizsgáltuk arra vonatkozóan, hogy azok okoznak-e az árpában nem kívánt géncsökkentési folyamatokat.

A kiválasztott árpa miRNS prekuzort *Rebecca Schwab* és *mtsai* (2006) által leírt szempontok alapján alakítottuk át, hogy azokról a vírusra specifikus amiRNS-ek processzálódnak.

A mesterséges miRNS génekről kialakuló, WDV vírus *replikáz és mozgási fehérje* génjére specifikus amiRNS-eket Northern hibridizációval detektáltuk.

A hvu-miR171-es prekuzort alapul véve megterveztük és megszintetizáltattuk az öt mesterséges miRNS gént tartalmazó polycisztronikus konstrukciót, amelyet *CaMV* 35S promóter és terminátor közé ligáltunk, majd *Nicotiana benthamiana* növényekben agroinfiltrációval termeltettük. A dohány növény levelében processzálódó amiRNS-eket Northern hibridizáció segítségével radioaktív DNS oligóval detektáltuk.

2.5 Inverted-repeat konstrukció építése

Építettünk egy WDV *replikáz* specifikus inverted repeat konstrukciót. Amelyet először úgy terveztünk meg, hogy a két komplementer szekvenciát a bináris vektor (pCambia2300) multi cloning-site-jának két végére illesztjük be. Mivel az antiszensz részét az IR konstrukciónak egyszer sem sikerült beligálnunk, ezért először egy „spacer” szekvenciát ligáltunk a WDV *replikáz* szekvencia mellé, majd egy következő ligálással beleillesztettük annak antiszensz változatát. Több olyan klónt is kaptunk, amiből kirekombinálódtak darabok. Egy klónt találtunk, ami megfelelőnek bizonyult a szekvenálás alapján, viszont a GFP-target szenzor kísérletekben negatív eredményt kaptunk. Mivel az eleve precízebb és hatékonyabb miRNS alapú technológiával több eredményt értünk el, úgy döntöttünk, hogy az energiát és a pénzt a továbbiakban erre összpontosítsuk.

2.6 A mesterséges miRNS-ek biológiai aktivitásának tesztelése

Ahhoz, hogy a mesterséges miRNS-ek biológiai aktivitásáról meggyőződjünk egy GFP alapú target-szenzor konstrukciót építettünk. Az mGFP5 gén 3'-nem transzlálódó régiójába fuzionáltattuk a WDV specifikus amiRNSek target szekvenciáit. Így az erről transzkriptálódó RNS tartalmazni fogja azokat a *replikáz és mozgási fehérje* szekvenciákat, melyeket a RISC-komplexbe épült amiRNS-ek felismernek, majd degradálják azokat. Ha az amiRNS-ek nincsenek jelen, a szenzor RNS-ről biológiailag aktív GFP fehérje képes transzlálódni.

A konstrukciót pBIN61GFP vektorban hoztuk létre.

2.7 *Agrobacterium*-közvetített WDV fertőzés

J. N. E. RAMSELL (2009) és munkatársai alapján laborunkban meghonosítottunk egy *Agrobacterium*-közvetített vírusfertőzési rendszert a Tóbiás Istvántól kapott WDV-h07-es vírustörzsre alapozva. A konstrukció lényege, hogy egy bináris vektor (pPZP-201) T-DNS határszekvenciái közé a vírust 1,5-szeres méretében klónozzuk. Az *Agrobacterium*-fertőzést követően a növény sejtmagjába jutó T-DNS-ről homológ rekombinációval képes kialakulni a biológiailag aktív cirkuláris DNS vírus.

A létrehozott konstrukciót (pPZP201WDV-h07_1,5MER) tartalmazó agaróz táplemezen felnőtt AGL-1 *Agrobacterium*-mal előre vízbe áztatott Golden promise árpa magokat kentünk be. Ezt követően a magokat egy 0,3 mm átmérőjű tűvel 3-5-ször megszúrtuk az embrió környékén, majd egy napos inkubációt (23 °C, sötétben) követően üvegházba kiültettük őket. A növényeket 4-5 hét elteltével Southern és Northern hibridizációnak vetettük alá a vírus kimutatására vonatkozóan.

2.8 Rovarvektoros vírusátviteli kísérletek

Az *Agrobacterium*-közvetített vírusfertőzési kísérletekből kikerült 10 fertőzött növény levelére mikroizolátorokat helyeztünk, melyekbe 3-5 Csíkos gabonakabócát (*Psammotettix alienus* Dhalb.) helyeztünk el. Egy hét elteltével a rovarokat áthelyeztük 3-4 leveles fiatal árpanövényekre, melyeken egy további hetet töltöttek el.

2.9 Árpa promóter és terminátor régiók keresése

Az NCBI adatbázisban rátaláltunk két árpa ubiquitin génre (*mub1*, *mub2*). A Gausing, K. és mtsai (1990) által meghatározott promóter és terminátor régiókra PCR primereket terveztünk. A *mub1*-es gén promóterét (~560 bázispár) egy GUS gént tartalmazó promóter tesztelő vektorba (pCambia1391z), terminátorát (~380 bázispár) pedig egy saját tervezésű, szintén GUS gént tartalmazó plazmidba építettük (pCubi1GUST::*mub1*). A *mub2*-es gén promóterét is sikerült izolálnunk, viszont az általunk használt Golden promise fajtában ennek a génnek egy mutáns változatát találtuk meg. A *mub2*-es gén promóterében egy ~100bp-os inszerciót találtunk. Ezt a 857 bázispáros szekvenciát is szintén pCambia1391z vektorba klónoztuk.

Egy internetes adatbázisba illesztettük a *mub1* és a *mub2* gént és rátaláltunk egy eddig leíratlan, feltételezhetően szintén *ubiquitin* génre, melynek szekvenciája az ATG-től több, mint 90%-ban megegyezett a *mub* génekével. Ennek a feltételezett ubiquitin génnek is izoláltuk az 5'- szabályozó régióját (1200bp), melyet szintén pCambia1391Z vektorba ligáltuk.

Árpára alkalmazott megfelelő tranziens rendszer hiányában még nem tudtuk kipróbálni a promóter konstrukciókat. A jövőben szeretnénk ezeket a promótereket rizsben kipróbálni egy nemrégiben megjelent cikkre (ANDRIEU et al., 2012) alapozva. A cikkben egy *Agrobacteriumra*-alapozott tranziens GUS expressziót írnak le rizs növény levelében.

2.10 Árpa *in vitro* regenerációs és transzformációs rendszer

Sikeresen adaptáltuk laborunkban a Joanne G. Bartlett és mtsai (2008) által leírt, éretlen embrióra kifejlesztett *in vitro* árpa regenerációs rendszert Golden promise tavaszi típusú árpafajtára.

Laborunkban meghonosítottuk a szintén *Joanne G. Bartlett* és *mtsai* (2008) által leírt agrobakteriális transzformációs rendszert. A megközelítően 1,5-2 mm nagyságú éretlen embriókat – az axis eltávolítását követően – pCambia1391Z vektort (*hptII* gén) tartalmazó AGL-1 *Agrobacterium* törzsszel fertőztük. Ezt követően az embriók Dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) hormont tartalmazó, kalluszosító táptalajra kerültek. A petricsészéket 23 °C-os sötét termosztátba helyeztük. Három napos inkubációs időt követően megkezdtük az *Agrobacterium* előlését és a hygromicin génre (*hptII*) történő szelekciót 300 mg/l cefatoxim és 75 mg/l hygromicin jelenlétében. Az embriókat 3*2 hétig kalluszosítottuk ezen a táptalajon, ezt követően a kalluszok átkerültek 2,4D-t (2,4-diklór-fenoxi-ecetsav) és BAP (6-benzil-amino-purin) hormonokat tartalmazó regenerációs táptalajra, ahol hetente passzáltuk őket. Három hét elteltével a bezöldülő kalluszokat hormonmentes táptalajra helyeztük. Az itt fejlődő 2-3 leveles növényeket Jiffy tápkockába ültettük ki üvegházba.

2.11 Árpa transzformációs vektorok létrehozása

Az előkísérletekben használt pCambia2300 alapú bináris vektorból (pC61K) a polycisztronikus amiRNS-t tartalmazó 35S kazettát áthelyeztük egy *hptII* hygromicin rezisztencia gént hordozó bináris vektorba (pCambia1300), melyet pC61HVirusBuster171 névre kereszteltünk. Szintén pCambia1300 vektorban létrehoztunk egy kukorica *polyubiquitin* promótort (Ubi1) és NOS terminátort tartalmazó transzformációs vektort, melyek közé klónoztuk a polycisztronikus amiRNS konstrukciót (pCUBi1VirusBuster171NOS).

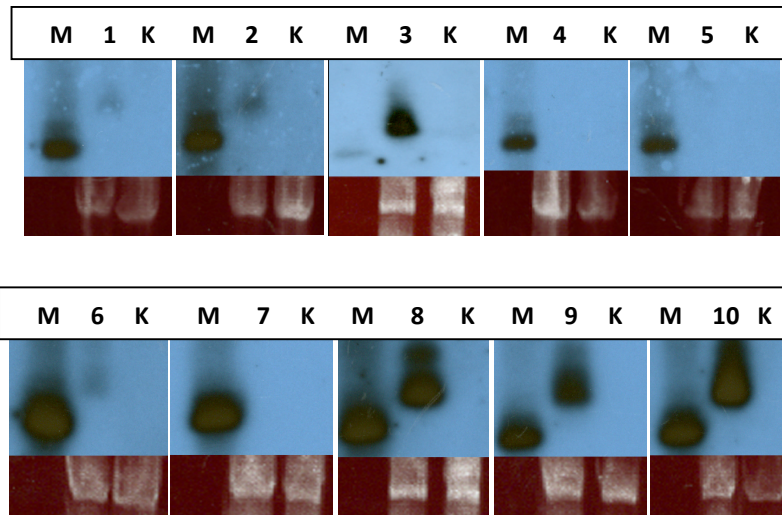
3. Eredmények

Klónoztunk három árpa miRNS gént, melyek közül kiválasztottuk a hvu-mir171 prekurzorát (138nt). Ebből létrehoztunk egy technológiailag könnyebben alkalmazható prekurzort (hvu-mir171MOD), melyet megvizsgáltunk a miRNS érésre vonatkozóan (4. ábra), ahol azt tapasztaltuk, hogy a módosított prekurzorról magasabb mértékű miRNS felhalmozódást tudunk kimutatni, ami feltehetően technikai okok miatt jött létre.

Az NCBI adatbázisban megtalálható WDV és BDV vírusok árpa és búza törzseinek összehasonlítását követően azok *replikáz* és *mozgási fehérje* génjeinek konzervatív szegmenseire összesen 136 és 31 potenciális miRNS target helyet határoztunk meg a miRNS tervezés szabályainak figyelembe vételével. A target helyek további kiválasztásánál az azokra specifikus amiRNS-ek árpában meghatározható OFF-target hatása volt a fő szelekciós szempont.

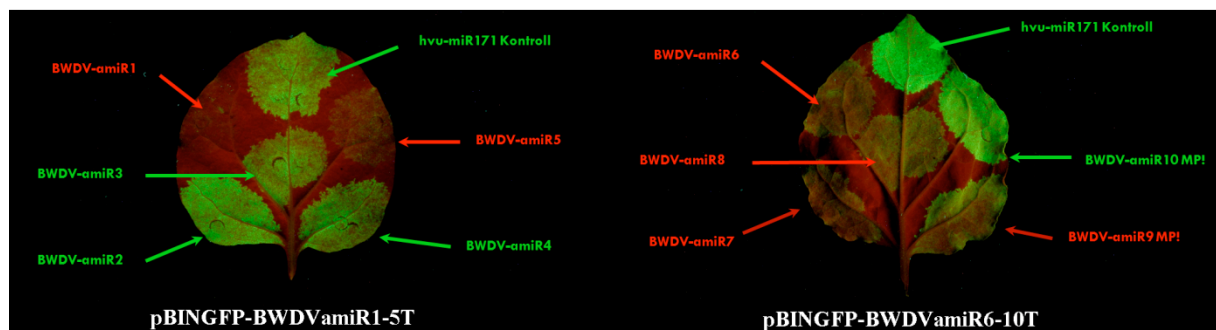
A hvu-mir171MOD prekurzorra alapozva 10 WDV specifikus amiRNS prekurzort hoztunk létre. A WDV vírus *replikáz* (BWDVamiR1-8) és *mozgási fehérje* (BWDVamiR9-10) génjeire specifikus amiRNS-ek target helyeit úgy választottuk ki, hogy azok átíródo, konzervatív szekvenciákat vegyenek célba. Ez a törekvésünk egyrészt arra irányult, hogy a vírus mutációja következtében létrejövő rezisztencia inaktíválódás lehetőségét csökkentjük, másrészt, hogy a létrehozott amiRNS konstrukciók a rokon vírustörzsekre (WDV búza törzs; BDV árpa és búza törzs) is rezisztenciát biztosítsanak.

A 10 amiRNS konstrukciót Northern hibridizációval vizsgáltuk a kis-RNS felhalmozódásra vonatkozóan (5. ábra). Három amiRNS-t (amiR4-5-7) ez idáig nem tudtunk detektálni.



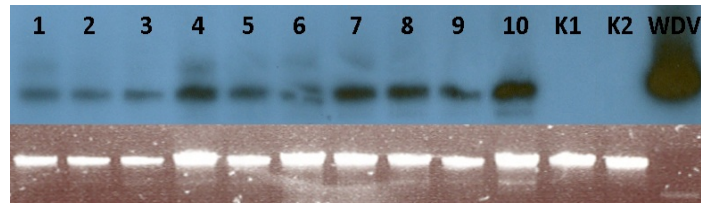
5. ábra: A mesterséges miRNSek (amiRNS) detektálása Northern hibridizációval (M: DecaLabel Marker; 1-10: amiR1-amiR10)

A mesterséges miRNS-ek biológiai aktivitásának vizsgálatára létrehoztunk két GFP-target-szenzor konstrukciót (pBINGFP-BWDVamiR1-5T; pBINGFP-BWDVamiR6-10T), melyek 5-5db amiRNS target helyet tartalmaztak a 3' nem transzlálódó régiójukban. Az agroinfiltrációs kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a 10 amiRNS-ből 6 volt képes szignifikánsan lecsökkenteni a GFP expressziót (6. ábra). Azt is tapasztaltuk a kísérletekben, hogy az amiRNS szint nincs feltétlenül összefüggésben az általa létrehozott fenotípussal. Voltak amiRNS-ek, melyeket alig, vagy egyáltalán nem voltunk képesek kimutatni (amiR1 amiR5, amiR6, amiR7), mindemellett a biológiai aktivitás kísérletben meglepően jó eredményeket mutattak. Voltak viszont amiRNSek (amiR3, amiR9, amiR10), melyek igen nagymértékű érést mutattak, viszont a biológiai aktivitásuk gyengébbnek, vagy elégtelennek bizonyult.

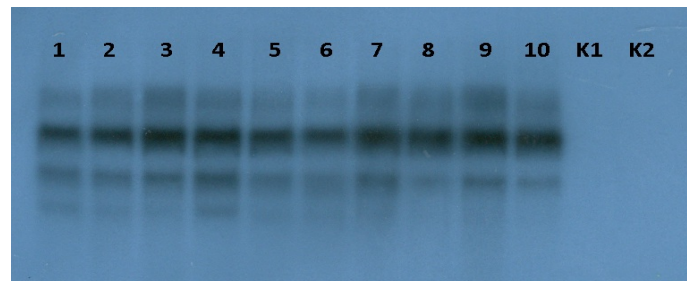


6. ábra: Az amiRNS-ek biológiai aktivitásának vizsgálata agroinfiltrációs rendszerben

Az *Agrobacterium*-közvetített WDV fertőzést követően 4-5 hét elteltével DNS-t és RNSt vontunk ki a növényekből, majd 10 kiválasztott növényen Southern és Northern hibridizációt hajtottunk végre WDV replikáz specifikus próbával (7-8. ábra). A kísérletben összesen 100 árpamagot inokuláltunk melyekből összesen 80 növényt tudtunk felnevelni. A tünetek alapján ~30%-os hatékonyságot értünk el.



7. ábra: WDV replikáz Southern hibridizáció



8. ábra: WDV replikáz Northern hibridizáció

A 10 molekulárisan is elemzett WDV fertőzött növényről Csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dhalb.) segítségével is átvittük a vírust egészséges árpa növényre. Tíz növényből csupán három esetében kaptunk pozitív eredményt. Ez betudható talán annak is, hogy az üvegházunkban folyamatos inszekticid permetezés zajlott a kísérlet megkezdése előtt, ez feltehetően – bár az állatok nem pusztultak el – torzítja az eredményeinket. A közeljövőben szeretnénk kidolgozni egy „dupla” fertőzési rendszert, amellyel növelhetnénk a rovarvektoros vírusátvitelt.

Létrehoztunk két árpa transzformációra alkalmas bináris vektort (pC61HVirusBuster171 és pCubi1VirusBuster171NOS), melyek tartalmazzák a letesztelt 5 amiRNS-t hordozó polycisztronikus konstrukciót.

A polycisztronikus amiRNS konstrukció az alábbi amiRNS-eket tartalmazza: BWDV-amiR1, BWDV-amiR5, BWDV-amiR6, BWDV-amiR7, BWDV-amiR8.

A Joanne G. Bartlett és mtsai (2008) által kidolgozott transzformációs rendszerre alapozva megkezdtük a fent említett vektorokkal az árpa transzformációt. Ez idáig 5 PCR pozitív növényt tudtunk szelektálni, melyek tesztelése folyamatban van. Következésképpen szeretnénk már a T0 növényeket alávetni a rovarvektoros vírusátvitelnek és párhuzamosan molekulárisan bizonyítani a transzgénről történő amiRNS felhalmozódást.

IRODALOMJEGYZÉK

- AURÉLIE ANDRIEU, JEAN CHRISTOPHE BREITLER, CHRISTELLE SIRÉ, DONALDO MEYNARD, PASCAL GANTET AND EMMANUEL GUIDERDONI - An in planta, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Rice* 2012, 5:23
- BARTEL D. P. (2004): MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116:281-297
- BAULCOMBE D. (2005): RNA silencing. *Trends Biochem Sci* 30: 290-300.
- GAUSING, K. AND JENSEN, C. B. - Two ubiquitin-long-tail fusion genes arranged as closely spaced direct repeats in barley. *Gene*, 94 (1990) 165-171
- HELLIWELL C. A., AND WATERHOUSE P. M. - Constructs and Methods for Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing in Plants. *Methods Enzymol* 2005, 392:24-35.
- J. N. E. RAMSELL, M. I. BOULTON, D. P. MARTIN, J. P. T. VALKONEN AND A. KVARNHEDEN - Studies on the host range of the barley strain of Wheat dwarf virus using an agroinfectious viral clone. *Plant Pathology* (2009) 58, 1161–1169
- JOANNE G BARTLETT, SÍLVIA C ALVES, MARK SMEDLEY, JOHN W SNAPE AND WENDY A HARWOOD - High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 2008 4:22
- REBECCA SCHWAB, STEPHAN OSSOWSKI, MARKUS RIESTER, NORMAN WARTHMAN AND DETLEF WEIGEL - Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006;18;1121-1133
- SILHAVY D. & BURGÁN J. (2004): Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9:76-83.
- TÓBIÁS, I.; KISS, B.; PÁJTLI, É.; THOLT, G.; SALÁNKI, K. – A Búza törpülés vírus (Wheat Dwarf Virus) árpa törzsének jellemzése és átviteli kísérletek. *NÖVÉNYVÉDELEM* 44 (11), 2008, 545-552

Publikációk

Eredményeinket az alábbi tudományos konferenciákon prezentáltuk:

Előadások:

MBK Napok, Gödöllő 2011. november 10. és 2012. december 4.

MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában

Kis András*; Bán Rita**; Havelda Zoltán*; Jenes Barnabás*

*Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

**SZIE, Növényvédelmi Intézet

Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 2012. március 6.

MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában

Kis András*; Bán Rita**; Havelda Zoltán*; Jenes Barnabás*

*Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

**SZIE, Növényvédelmi Intézet

Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2013. február 19.

MikroRNS alapú vírusrezisztencia kialakítása árpában

Kis András*; Eitel Gabriella*; Ivanics Milán*; Bán Rita**; Havelda Zoltán*; Jenes Barnabás*

*Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

**SZIE, Növényvédelmi Intézet, Gödöllő

Poszterek:

Hungarian Molecular Life Science 2013. április 5-7

Artificial miRNA-mediated virus resistance in barley

KIS ANDRÁS¹; BÁN RITA²; EITEL GABRIELLA¹; IVANICS MILÁN¹; HAVELDA ZOLTÁN¹ & JENES BARNABÁS¹;

¹Agricultural Biotechnology Centre, Gödöllő

²Szent István University, Plant Protection Institute, Gödöllő