

Zárójelentés a K 83121 számú, "A gazdanövény-patogén kapcsolatban közreműködő növényi gének elemzése szőlő-agrobaktérium rendszerben: új lehetőségek a rezisztencianemesítésben" című OTKA pályázatról

1.) Bevezetés

A szőlő egyik legsúlyosabb betegsége az agrobaktériumos golyvásodás, mely ellen nem tudunk védekezni. Jellemző tünete a kalluszszerű tumorok megjelenése a növény fás részén, mely lehet lokális, vagy összefüggő, nagy kiterjedésű (Burr et al. 1998). A betegség okozója az *Agrobacterium vitis*, ritkábban az *Agrobacterium tumefaciens*. A tünetek sérüléssel keresztül mesterséges fertőzéssel is kiválthatók, nem csak szőlőn, hanem számos lágyszárú tesztnövényen is (1. ábra). A kórfolyamat során a baktérium genetikailag transzformálja a növényi sejtet. Ennek következtében a gazdanövény sejtjei elvesztik regeneratív képességüket, tumorsejtekkel alakulnak. A folyamatot a növényi sebzés során felszabaduló cukrok és fenolvegyületek indukálják, melynek következtében a baktérium tumor-indukáló plazmidjáról (pTi) megkezdődik számos virulencia fehérje, valamint a növényi hormon és opin géneket tartalmazó T-DNS szál képződése. A baktérium virulencia fehérje irányítja a T-szál átvitelét a prokarióta baktériumból az eukarióta növényi sejt sejtmagjába. Az átvitelben, de elsősorban a transzformáció késői szakaszában (T-DNS integráció a gazdasejt kromoszómális DNS-ébe és annak megnyilvánulása) számos növényi gén (protein) is közreműködik. A növények agrobaktériumos transzformációja kettő alapvető élettani változást okoz. Egyik a növényi hormonok (auxin, citokinin) szintézise, mely a tumorképződés közvetlen kiváltó oka. Az emelkedett hormontermelés következtében a golyvás (tumor) szövetek steril tenyészetekben fenntarthatók, illetve szelektálhatók hormonmentes táptalajon (ld. alább: *in vitro* tumor indukció szárszegmenteken). Másik pedig a specifikus aminosav származékok, az ún. opinok termelése, melyek szelektív tápanyagforrásként szolgálnak az indukáló, de csak az indukáló baktériumok számára. A kórfolyamat molekuláris hátteréről a közelmúltban számos részletes összefoglaló munka jelent meg (Bourras et al. 2015, Gelvin 2010, Gelvin 2012, Kado 2014, Nester 2015, Tzfira, Citovsky 2008). Az agrobaktériumok által a növényben indukált, illetve a baktérium által hasznosított opinok a pTi plazmidok (illetve agrobaktérium törzsek) osztályozásában alapvető fontosságúak. Szőlőn a leggyakrabban az *A. vitis* oktopin, nopalin és vitopin, valamint az *A. tumefaciens* (de *A. vitis*-re jellemző) oktopin és nopalin típusú pTi plazmiddal rendelkező agrobaktériumok károsítanak. Relatív gyakoriságuk azonban termőhelyenként és fajtanként eltérő (Szegedi 2003, Szegedi et al. 2005).

A kártétel csökkentésének egyik lehetősége, ha hagyományos vagy molekuláris nemesítési módszerekkel ellenálló fajtákat állítunk elő. A GMO-n alapuló rezisztencia nemesítés a patogén elpusztítását megelőzve alapulhat antibakteriális anyagokat (fehérjéket) kódoló gének beépítésén. Ez az út azonban környezetvédelmi okokból nem járható, mivel nyilvánvalóan felborítaná a növényi rhizoszférában, edénynyaláb rendszerben és a filloszférában lévő természetes mikroflórát. Ez a növényi tápanyagellátás zavarához, és/vagy eddig nem ismert új növénybetegségek megjelenéséhez vezethet. Másik lehetőség a patogén génjeire alapozva a T-DNS átvitel gátlása mutáns *vir* génekkel (Krastanova et al. 2010). A géncsendesítésen („silencing”) alapuló eljárások méginkább ígéretesnek tűnnek, mivel ebben az esetben nem jelenik meg új, idegen fehérje termék a növényben. Ezen a területen az elmúlt években széleskörű kutatásokat végeztek a különböző károsítókkal, így például a vírusokkal (Bonfim et al. 2007, Cruz et al. 2014, Jelly et al. 2012, Nahid et al. 2011, Shimizu et al. 2013), vagy rovarkártéveőkkel (Gu and Knipple 2013) szembeni ellenállóképesség kialakítása céljából. Az agrobaktériumos golyvásodás elleni védekezés terén a tumorképzésért közvetlenül felelős onkogének csendesítésén alapuló gátlásával is értek már el biztató eredményeket (Albuquerque et al. 2012, Escobar et al. 2001, Viss et al. 2003), azonban az így kialakított rezisztencia az agrobaktériumok onkogénjeinek jelentős genetikai diverzitása miatt nem biztos, hogy megfelelően széleskörű.

Mivel a különböző agrobaktérium törzsek vélhetően ugyanazokat a növényi (gazdasejt) mechanizmusokat használják a transzformáció folyamata során, ezért mi elsősorban nem a patogént, hanem a gazdanövény transzformációban közreműködő génjeit céloztuk meg. Ezek gátlása ugyanis ellenállóvá teheti a növényt az agrobaktériumos transzformációval szemben (Gelvin 2010). Célunk, hogy az *Arabidopsis* és dohány agrobaktériumos transzformációjában igazoltan közreműködő gének ortológjait azonosítsuk szőlőben, majd ezek mRNS szinten történő gátlásával a golyvásodásnak ellenálló szőlőt állítsunk elő.

2.) Bioinformatikai (*in silico*) kutatás a szőlő genomban található homológ gének azonosítására

Első lépésben bioinformatikai módszerekkel megkíséreltük azonosítani a 12x lefedettségű szőlő (*Vitis vinifera* cv. 'Pinot noir') genomban (Jaillon et al. 2007) az *Arabidopsis*-ban (lúdfű) és dohányban leírt (Gelvin 2010), az agrobaktériumos transzformációban közreműködő fehérjék homológjait kódoló géneket (pl. cellulóz szintáz-szerű proteinek, BTI proteinek, GTP-ázok, hisztonok). Azokat a géneket, melyeknek a mutációval, vagy géncsendesítéssel történő inaktiválása eddigi irodalmi adatok alapján befolyásolta a növény normális fejlődését, illetve köztudottan esszenciálisak a növény számára (pl. aktin, hiszton3) nem vettük figyelembe. Ennek alapján

tblastn programmal az alábbi szekvenciákat gyűjtöttük ki: (1) Az agrobaktérium növényi sejtbe való kötődésében szerepet játszó cellulose szintáz-szerű CslA-09-re a szőlő genomában végzett keresést követően négy homológ gént azonosítottunk, melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak az *Arabidopsis* CslA-09 génnel. (2) A T-DNS és Vir fehérjék átvitelében fontos BTI retikulon-szerű fehérjéket meghatározó gének szőlőben rendkívül nagy, mintegy 57 tagú családot képeznek. A géncsalád kettő tagját választottuk ki a további vizsgálatokra. (3) A Rab8GTPáz géncsalád még nagyobb, mintegy 75 tagból áll szőlőben. A homológok nagyfokú hasonlósága miatt itt nehéz volt egy-egy tagra specifikus primereket tervezni. (4) A VIP1 protein a T-DNS növényi sejtbe történő transzportját irányítja. A tblastn keresés alapján a család szőlőben 22 tagot számlál, melyekből hatra terveztünk és készítettünk primereket. (5) A T-DNS integrációban meghatározó szerepet játszó hiszton génekre (H2A) szőlőben 16 találat volt. A fenti gének expressziójának vizsgálatára a kontrollként használt aktin génnel együtt összesen 18 primerpárt terveztünk (1. táblázat), illetve használtunk fel szőlő DNS mintákon való ellenőrzésüket követően (2. ábra). Az azonosított géneknek elvégeztük a filogenetikai analízisét (3. ábra).

A pályázat beadását követően további három, az SCF-komplexhez kapcsolódó növényi közreműködő gént azonosítottunk. Ezek közül az agrobaktérium *virF* génjével (VirF fehérjéjével) funkcionálisan homológ VBF-el (Zaltsman et al. 2010, Zaltsman et al. 2013) nem foglalkoztunk, mivel a VBF gén elcsendesítése növényben csak a *virF*-mínusz *Agrobacterium* törzsekkel szemben határoz meg ellenállóképességet (*A. vitis* vitopin törzsek, *A. tumefaciens* nopalín törzsek). A szőlőt azonban a természetben számos *virF*+ agrobaktérium is károsítja (pl. *A. vitis* oktopin és nopalín törzsek, *A. tumefaciens* oktopin és agropin törzsek). Így ennek a gének az elcsendesítése szőlőben nem okozna megfelelő rezisztenciát a betegséggel szemben.

Az Skp1 és Sgt1 gének (Anand et al. 2012) viszont ígéretesnek tűntek. Ezek homológjait szintén megtaláltuk a *V. vinifera* cv. 'Pinot noir' genomában. A szőlőben nyolc Skp1 homológot azonosítottunk, amelyek közül három – az *A. thaliana* és *Nicotiana sp.* referencia génekhez legközelebb álló gén – nagymértékű hasonlóságot mutat egymással. Mivel jelen esetben expressziós vizsgálatokra nem állt rendelkezésünkre elég idő, olyan célszekvenciát kerestünk csendesítésre, amely mind a három lehetséges génjelöltet (VvSkp1a, VvSkp1b, VvSkp1c) csendesíti, ugyanakkor az 5 fennmaradó homológgal a csendesítésre használt szakasz nem mutat hasonlóságot. Az Sgt1 esetében *Arabidopsis sp.* és *Nicotiana sp.* referencia alapján 30 hasonló szekvenciát azonosítottunk szőlőben. Ezek közül egy homológ határozottan együtt csoportosult a referencia szekvenciákkal, így ezt (GSVIVT01028818001, VvSgt1) jelöltük ki csendesítésre. Az újonnan kiválasztott VvSkp1 és VvSgt1 gének 3'UTR régiójának csendesítésre kijelölt szakaszára specifikus primereket terveztünk (2. táblázat). A szakaszt PCR segítségével felszaporítottuk, a termékeket pJet (Thermo Scientific) vektorba klónoztuk, majd szekvenciájukat ellenőriztük.

3.) A szőlőben azonosított homológ gének reakciója *Agrobacterium* fertőzésre

Annak eldöntésére, hogy a fenti, *in silico* azonosított gének működését az agrobaktérium hogyan befolyásolja *V. vinifera* cv. 'Pinot noir' és 'Sauvignon blanc' szőlőfajták levélkorongjait az *A. tumefaciens* C58 törzsszel kezeltük. A kivont RNS mintákat szemikvantitatív rt-PCR-el elemeztük. Referenciagénként az aktint használtuk. A vizsgálatok során a négy Csl_A homológ közül egyik sem adott ismételt válasz. A retikulon-szerű fehérjéket meghatározó VvRtnl gének (BTI) működésében nem észleltünk szignifikáns változást az *Agrobacterium*-fertőzést követően. A VvRab8a (GTPáz) expressziójában viszont csaknem négyszeres különbséget tapasztaltunk az agrobaktériumos indukció után. Hasonlóan biztató eredményeket kaptunk a Vip1a, a VvHta10 és a VvHta2 (hiszton) gének expressziójának vizsgálatára is (4. ábra). Eredményeink alapján tehát a fenti négy gén (VvRab8a, Vip1a, VvHta10 és VvHta2) feltételezhető szerepet játszik a szőlő agrobaktériumos kórfolyamatában. A gének feltételezett szerepének igazolására azok 3' UTR-régiójára csendesítő konstrukciókat hoztunk létre (2. táblázat, részletesen ld. 7. pont).

A 2.-3.-ból megjelent közlemény: Deák et al. (2013) *Centr Eur J Biol* 8: 1001-1009.

4.) Embriogén kallusz tenyészetek előállítása szőlő transzformációhoz

Mivel szőlőből nem tudunk közvetlen regenerációval növényt előállítani, ezért a szőlő genetikai transzformációja során a legszélesebb körben alkalmazott módszer embriogén kallusz, illetve szomatikus embriók sejtjeinek transzformációja és az abból történő növényregeneráció. Munkánk során az alábbi alany és nemes fajtákból illetve klónokból izoláltunk portokat (összesen mintegy 19 800 darabot) embriogén kallusz előállítás céljából. Alany fajták: 'T5C', 'GM6', 'Richter 110', 'Georgikon 28', 'SO4'. Nemes fajták: 'Hárslevelű p47', 'Hárslevelű p41', 'Hárslevelű p22', 'Furmint p41', 'Furmint p19', valamint 'Rajnai rizling'. Sikeresen állítottunk elő embriogén kalluszt 'Richter 110', 'Hárslevelű p47', 'Hárslevelű p41', 'Furmint p41' és 'Rajnai rizling' fajták, illetve klónok esetében. A felszaporítás gyorsasága a 'Richter 110' fajtánál tette lehetővé a kísérletek megkezdését. A sikeres genetikai transzformáció egyik legmeghatározóbb lépése a hatékony és sikeres növényregeneráció. Ezért az eddig sikeresen alkalmazott szilárd táptalajon történő szomatikus embriogenezis mellett vizsgáltuk folyékony embriogén sejtuszpenziók létesítésének és fenntartásának feltételeit folyékony tápközegben is.

A differenciálatlan embriogén kallusz felszaporítása (proliferációja) és az embriogenezis indukciója eltérő fizikai paramétereket igényel. Az embriogén sejtszuszpenziók létesítéséhez többféle táptalaj hatását vizsgáltuk 'Richter 110' és 'Chardonnay' fajták esetében: MS (Murashige and Skoog), CP (Chée and Pool) valamint Gamborg B5 alaptáptalajokat különböző hormon (2-4-D, NOA) valamint szénforrás kiegészítéssel (maltóz, szacharóz). A 'Richter 110' fajta embriogén sejt kultúráival 6 különböző fenntartási technika friss tömeg gyarapodásra gyakorolt hatását hasonlítottuk össze, valamint elkezdtük az embriogenezis indukciójának vizsgálatát. Különböző paraméterek embriogenezisre gyakorolt hatását vizsgáltuk, pl. eltérő táptalajok (hormonmentes MS és ½MS), eltérő sejtsűrűség, aktív szén, MES (morfolino-etánszulfonsav), valamint laktalbumin hidrolizátum alkalmazásával.

A különböző táptalajok összehasonlító vizsgálatakor legnagyobb friss tömeggyarapodást MS és CP táptalajok esetén tapasztaltunk, mikor szénhidrátforrásként maltózt (18 g/l), hormonként pedig NOA-t (1 mg/l) használtunk. Ezen táptalajok esetén a tömeggyarapodás a 6. hét végére duplája volt a többi táptalaj esetén mért értékeknek. A különböző fenntartási technikák közül leghatékonyabbnak a 0,5 g/100 ml kezdeti denzitást találtuk, mikor hetenként a táptalaj 1/3-át eltávolítottuk majd friss táptalajjal a sejtsűrűséget a kiindulási szintre állítottuk be. Ebben az esetben az 5. hétre mintegy 45-szörös frisstömeg-gyarapodást értünk el. Az embriogenezis indukciójához alkalmazott hormonmentes MS táptalaj esetén a vizsgált sejtsűrűségek közül (0,25-4 mg/ml) leghatékonyabbnak a 2 mg/ml-t találtuk, de még ez is elmaradt a 0,5 g/l MES-sel kiegészített táptalaj hatékonyságától. A MES kiegészítés hatására az embriogenezis korai stádiumban megrekedt, ami viszont a kultúra további jelentős hígításával feloldható volt és 10 nap után fejlett embriók jelentek meg a táptalajban. A hormonmentes ½MS táptalajon a 3. hétre megjelenő szinkronizált globuláris struktúrák számában jelentős emelkedést tapasztaltunk, ha a táptalajt 1 g/l laktalbumin hidrolizátummal egészítettük ki. A további fejlődés a denzitás jelentős csökkentése nélkül megrekedt, ami a sejtsűrűség csökkentésével és hormonmentes, aktív szénnel (1 g/l) kiegészített MS táptalaj használatával feloldhatónak bizonyult. A két különböző regenerációs rendszer morfológiailag jelentősen eltérő embriók fejlődését eredményezte. MES alkalmazása esetén az embriók sziklevele kevésbé fejlett, valamint a szikalatti szár erősen megnyúlt. ½MS hormonmentes, majd MS táptalaj alkalmazása esetén (aktív szén kiegészítéssel) jól fejlett sziklevelű embriókat kaptunk, ahol a sziklevel hossza az embrió hosszának legalább felét tette ki. Mindkét módszer esetén sikeresen regeneráltunk teljes 'Richter 110' növényeket a sejtszuszpenziókból.

2012-ben a 'Richter 110', 'Rajnai rizling' és 'Chardonnay' fajtáknak mintegy 15 000 portokjából állítottunk elő embriogén kallusz kultúrákat. Lugol-oldattal történő festést követően 3 különböző sejttaggregátum típust különítettünk el a sejtszuszpenziókban. I-es típus: szabálytalan alakú sejttaggregátum a felszínén jól elkülöníthető gömbölyű különálló sejtekkel. A sejtekben nagy számban található keményítőszemcsék. II-es típus: az aggregátumok felszíne lekerekített, jól elkülönülő sejteket nem tartalmaznak. A felszínükön megjelenő globuláris képletek sejtes szerkezete nem kivehető, keményítő szemcsékben gazdag sejteket nem tartalmaz. III-as típus: Az aggregátumok felszínén nagyméretű, világos globuláris struktúrák jelennek meg, melyek a Lugol-oldat hatására nem festődnek (5. ábra). Az embriogén sejtszuszpenziók létesítéséhez legmegfelelőbbnek az I-es típust találtuk.

Hat különböző ½MS vagy MS alapú, 1 g/l laktalbumin hidrolizátummal kiegészített hormonmentes táptalaj (R1, R2 táptalajok) hatását vizsgáltuk különböző sejtsűrűség mellett a szomatikus embriogenezis indukciójára. A proliferáció során alkalmazott sejtsűrűség (5 mg/ml) után csökkentett 1 mg/ml denzitást alkalmaztunk. Az 5. hétre a kultúrákban globuláris proembriók/gömb stádiumú embriók nagyfokú szinkronizációját tapasztaltuk. A további differenciálódás viszont ezekben a kultúrákban nem volt tapasztalható, aminek feltételezhető oka, hogy az embriók nagy száma reverzibilisen gátolja a további differenciálódást. A denzitás további csökkentését követően ez a gátló hatás feloldható. Az újbóli hígítás hatására R2 és R3 táptalajon (½MS alapú táptalaj 1 g/l aktív szénnel kiegészítve) eltérő morfológiájú embriók differenciálódását tapasztaltuk. MES (0,5 g/l 2-N-morfolino-etánszulfonsav) alkalmazása esetén (R2) a 10. napra bazális részükön erősen megnyúlt, torz sziklevelű embriók fejlődtek, melyekből sikeresen regeneráltunk MSEM táptalajon növényeket (6. ábra). Alacsonyabb sűrűség esetén (1 mg/ml) szikleveles embriók alkották többségében a kultúrákat. A denzitás emelésének hatására a szikleveles embriók száma drasztikusan csökkent, 10 mg/ml koncentráció esetén a kultúrák szív stádiumban megrekedtek, míg 2. hígítás hiányában a kultúrák további differenciálódást nem mutattak. MSEM szilárd táptalajon ez a gátlás megszűnt és sikeresen regeneráltunk minden fenntartási mód esetén növényeket, bár ezek számában jelentős különbségeket tapasztaltunk. Leghatékonyabb regenerációt abban az esetben tapasztaltunk, mikor 2. hígításkor a táptalajt aktív szénnel is kiegészítettük. Ebben az esetben a 2. hígítás végére az embriók sziklevele elérte vagy meghaladta az embriók teljes hosszának az 50%-át. Feltételezzük, hogy mind az aktív szén az embriogenezis késői fázisában, mind az ½MS alapú táptalajról teljes MS-re történő váltásból adódó ozmotikus stressz erősen indukálja a szomatikus embriogenezist. Ebben az esetben több, mint 2 millió embrió fejlődik 1 g embriogén sejtszuszpenzióra számolva, míg e kezelése nélkül mintegy 0,8 millió embrió differenciálódik. A 2. hígítás esetén magas, azaz 10 mg/ml denzitás mellett ez az érték kb. 0,4 millió embrióra csökken. Tapasztalatunk szerint minden esetben ezek az embriók csírázásukat követően közel 100%-ban fel is nevelhetőek. Az általunk eddig alkalmazott szilárd táptalajon történő regenerációs rendszer esetén 1 g kalluszból mintegy 35000 embrió regenerációja lehetséges 'Richter 110' fajta esetében, így kb. 60-szor hatékonyabb folyadék alapú regenerációs rendszert sikerült kifejlesztenünk.

5.) *In vitro* tesztelési módszerek vizsgálata a rezisztens genotípusok szelekciója céljából

A pályázati feladatok megvalósításához steril *in vitro* tenyészeteket hoztunk létre az OTKA K68053 számú pályázat keretében előállított 'Sárfehér' x 'Kunbarát' hibridcsalád hét agrobaktérium-rezisztens és nyolc fogékony egyedéből, valamint a következő 12 ismert szőlőfajtából: *Vitis vinifera* cvs. 'Arany Sárfehér', 'Chardonnay', 'Ezerjő', 'Fanny', 'Kadarka', 'Kövidinka', 'Kunleány' és 'Sauvignon blanc', valamint *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris* cv. 'Richter 110', *V. berlandieri* x *V. riparia* 'Teleki-Kober 5BB', *V. riparia* 'Gloire de Montpellier' és 'FS4' [(*V. vinifera* x *V. riparia*) x *V. vinifera*] (7. ábra).

A 'Sárfehér' x 'Kunbarát' hibridek *A. tumefaciens* C58 törzssel szembeni fogékonyságát szárszegment teszteken vizsgáltuk, hormonmentes táptalajon. A szárszegment teszt előnye, hogy kevés növényből kiindulva nagyszámú ismétlésben tudjuk végezni a teszteleseket. Az ellenállóképességet/fogékonyságot tekintve tüneti alapon nem kaptunk teljes összefüggést a korábbi üvegházi és a laboratóriumi eredmények között, mivel számos üvegházban rezisztensnek talált magoncon kaptunk több/kevesebb kalluszt hormonmentes táptalajon. Ugyanakkor ezek a kalluszok nem tartalmaztak nopalint, ami a C58 törzssel indukált tumorok jellemző tulajdonsága. Az értékelhetőség nem egyértelmű jellege miatt ezt a módszert nem tartjuk alkalmasnak a rezisztens genotípusok korai szelekciójára. A következő lépésben intakt növényeket fertőztünk üvegházban és *in vitro* (7. ábra). Ebben az esetben az üvegházi és az *in vitro* eredmények teljes mértékben megegyeztek. Ennek alapján a növények fogékonyságának *in vitro* tesztelésre biztonságosan csak intakt növények használhatók.

Ezt követően az *A. tumefaciens* A348 (oktopin típus), C58 (nopalin típus) és A281 (succinamopin típus), valamint *A. vitis* Tm4 (oktopin típus), AT1 (nopalin típus) és S4 (vitopin típus) törzsek tumorképző képességét teszteltük az üvegházban *A. vitis* fertőzéssel szemben fogékony 'Richter 110', 'Chardonnay', 'Fanny', 'Kadarka' és 'Sauvignon blanc' fajták szárszegmentjein. A 'Richter 110' fajtán az A281 a szárszegmenteknek (kb. 40 ismétlés, kettő kísérletben) 80-100%-án, az A348 és a C58 pedig mintegy 40-56%-ban indukáltak tumort. Ugyanakkor a termő (Európai) szőlőfajtákon a C58 mutatott magasabb, 75-100%-os virulenciát, az A348 és A281 általában kevésbé voltak patogének. A hormonmentes táptalajon kapott kalluszszerű szövetek tumoros jellegét opin tesztekkel erősítettük meg. A kísérletekhez kombinációként (szőlőfajta/agrobaktérium törzs) 12-12 független tumorvonalat használtunk. A vizsgált mintákból a megfelelő opin (nopalin-, vagy agropin/mannopin) minden esetben kimutatható volt (8. ábra).

A szőlőre specializálódott *A. vitis* törzsekkel (Tm4, AT1 és S4) a tesztelt öt szőlőfajta szárszegmentjeinek egyikén sem kaptunk tumort. Annak tisztázására, hogy mi okozza a szőlőre adaptálódott *A. vitis* avirulenciáját *in vitro* szárszegmenteken, az *A. vitis* S4 törzs és annak nekrozis-mínusz aviR- mutánsának (forrás: Prof. T. J. Burr, Cornell University, NY, USA) felhasználásával azt vizsgáltuk, hogy a tumort nem okozó S4 együttes fertőzésben hogyan befolyásolja a C58 virulenciáját szárszegment tesztben. Kontrollként a C58 plazmidtörölt származékát, az UBAPF2-t használtuk. Meglepő módon mind az S4, mind az S4 aviR- teljes mértékben gátolta a C58 általi tumor indukciót. Ugyanakkor az UBAPF2-nél csak részleges gátlás volt megfigyelhető (9. ábra). Korábbi kísérleteinkben bizonyítottuk (saját, nem közölt adatok), hogy az *A. vitis* poligalakturonáz-mínusz mutánsa sem képes szőlő *in vitro* szárszegment tesztben tumort indukálni. Ez a jelenség arra utal, hogy az egyébként szőlőre specializálódott, és azzal szoros, kizárólagos kölcsönhatásban élő *A. vitis* gazdaspecializációjában nem a patogén kiemelt virulenciája, hanem egyéb tényezők, mint például az ökológiai adaptáció, játszik meghatározó szerepet. Ilyen ökológiai adaptáció alapulhat pl. a szőlő által termelt tartarát, mint specifikus szénforráson, illetve az *A. vitis* specifikus tartarát hasznosító képességén (Kado 1998, Salomone et al. 1998). Továbbá, az *A. vitis* törzsek nem alkalmasak génektornak a szőlő genetikai transzformációjához. Embriogén kalluszok transzformációjának vizsgálata során amerikai kutatók is hasonló eredményre jutottak (Torregrosa et al. 2002).

Az *A. tumefaciens* A348, C58 és A281, valamint az *A. vitis* S4 törzsek virulencia régióinak összehasonlítása alapján az *A. vitis*-ből hiányoznak a *virH2* és a *virK* gének (10. ábra). A *virH2* (F: GATCCCTATCCGATTTATCGC/R: GGATTGGTCAGCAATCCA, 701 bp) és a *virK* (F: TYAYGGTYGATTTAAGTTTGTGT/R: GCCAAGCTGGTACCTTTTC, 259 bp) génekre specifikus indítószekvenciák felhasználásával PCR-el ellenőriztük, hogy az adott gének megtalálhatók-e a másik kettő *A. vitis* törzsben (AT1 és Tm4). A két gén jelenlétét a három *A. tumefaciens* törzsben ki tudtuk mutatni, de az *A. vitis*ekből hiányoztak (11. ábra). Bár eddigi eredményeink nem bizonyítják, de feltételezhető, hogy a *VirH2* és/vagy a *VirK* fehérjék esszenciálisak a tumorképződéshez szőlőn. Mivel az *A. vitis* ezeket a fehérjéket nem termeli, az intakt szőlő növény valamelyik fehérjéje/fehérjei képes(ek) ezeket komplementálni, de az izolált *in vitro* szőlő szárszegmentekben ez a protein már nem termelődik. Ez további agrobaktériumos transzformációban közreműködő, gazdaspecifikus növényi gének/fehérjék azonosítását eredményezheti.

A szárszegment fertőzéseket követően az 'Ezerjő', 'Kadarka', 'Sauvignon blanc', 'Kunleány', 'Fanny' és 'Richter-110' fajták *in vitro* nevelt intakt egyedek fertőztük a fenti hat agrobaktérium törzssel. A három *A. tumefaciens* törzs (A348, C58, A281) lényegesen gyorsabban indukált tumort *in vitro* szőlőkön, mint az *A. vitis* törzsek (Tm4, AT1 és S4). A nopalin-típusú C58 törzs mindegyik fajtán indukált tumort intakt növényen és szárszegment tesztben egyaránt, ezért a későbbiekben ezt a törzset használjuk a transzgenikus populációk tesztelésére. Az *in vitro* módszer előnye, hogy a szőlő populációk fogékonyságát folyamatosan tudjuk tesztelni, évszaktól függetlenül.

Az 5. eredményeiből megjelent közlemény: Szegedi et al. (2014) *Vitis* 53: 147-154.

6.) Az *Agrobacterium* által indukált gének előfordulása különböző szőlőfajtákban

Annak vizsgálatára, hogy a dohányban és a lúdfüben azonosított, agrobaktérium transzformációban közreműködő gének *V. vinifera* cv. 'Pinot noir' szőlőfajta genomjában azonosított homológjai megtalálhatók-e más szőlőfajtákban, a tervezett primerekkel összehasonlító kísérleteket végeztünk. Először az 5. pont első bekezdésben felsorolt 12 különböző szőlőfajtából DNS-t izoláltunk, majd a mintákat agaróz gélen ellenőriztük. A DNS-t minden esetben steril (*in vitro*) növényekből vontuk ki az esetleges szennyeződések elkerülése érdekében. A DNS mintákat ezután az agrobaktérium által indukált génekre specifikus négy primerpárral (Rab8a, Hta2, Hta10 és Vip1a, 1. táblázat) teszteltük az esetleges gének jelenlétére. A Rab8a, a Hta2 és a Hta10 specifikus primerekkel a Rab8a/FS4 kombináció kivételével valamennyi fajta genomi DNS-éből kimutatható volt az adott gén. A Vip1a génre specifikus primerekkel nem kaptunk PCR terméket, mivel a cDNS-re tervezett primerek közrefognak egy mintegy 6000 bp hosszú intront, amelyet a standard PCR reakció nem képes felszaporítani (12. ábra). Hasonlóan valamennyi mintából fel tudtuk szaporítani a VvSgt1 és VvSkp1 szekvenciákat is, ez a számunkra fontos eredmény a VvSgt1 és VvSkp1 gének nagyfokú homológiájára utal szőlőben, így a tervezett csendesítő konstrukciók hatékonyak lehetnek számos termő és alany szőlőfajtában.

A gének jelenléte mellett fontos kérdés a csendesítéssel megcélzott szakasz szekvencia szintű variabilitása is. A csendesítésre kijelölt szakaszokat a 'Richter 110' alanyfajtából pJET Easy (Fermentas) klónozó vektorba építettük, majd meghatároztuk a klónok szekvenciáját. A primertervezés alapjául szolgáló 'Pinot noir' nemes és az interspecifikus 'Richter 110' alanyfajta között a kontrollként használt Rtnl2 gén esetében a klónozott 289 bp-on 3 SNP-t és egy deléciót, a 124 bp hosszú Rab8a 3' UTR-nél 2 deléciót, a 165 bp hosszú Hta2 csendesítő szakasz esetében egy SNP-t, a 267 bp hosszú Hta10 szakasz esetében 3 SNP és egy deléciót detektáltunk, míg a Vip1a 214 bp hosszú 3' UTR szakasza nem mutatott nukleotid szintű variabilitást. Annak alapján, hogy a *V. berlandieri* × *V. rupestris* hibrid és a *V. vinifera* nemes fajta között ilyen nagyfokú homológiát detektáltunk a csendesítéssel megcélzott 3' UTR szakaszban, ezek a gének feltételezhetően nagyfokú homológiát mutatnak szőlőben, ami a későbbi munkánk szempontjából nagyon fontos.

7.) Gén-csendesítő vektorkonstrukciók létrehozása növényi transzformációhoz

Először a Waterhouse és mtsi által létrehozott klónozó rendszert (Wesley et al. 2001) terveztük felhasználni a csendesítő konstrukciókhoz. A munkához a pHANNIBAL és a pRok2 vektorokat a CSIRO Plant Industry-től (Limestone Avenue, Campbell, Australia), illetve az Arabidopsis Biological Resource Centerből (Ohio State University, Columbus, OH, USA) beszereztük. Szintén beszereztük a klónozáshoz szükséges oligonukleotid primereket. Úgy terveztük, hogy első lépésben a pHANNIBAL-ban létrehozzuk a csendesítendő konstrukciót. A beépítendő 200-400 bp hosszú 3' UTR szakaszt úgy határoztuk meg, hogy az ne mutasson 20 bp-on belül 70%-ot meghaladó homológiát a géncsalád bármely más tagjával. A klónozó vektorban található funkcióképes növényi intron két szélére, ellentétes orientációban kerül beépítésre a célszekvencia. Az intronnak köszönhetően transzkripció után hatékonyan alakul ki a kétszálú RNS hairpin struktúra, amely várhatóan csendesíteni fogja a célgént. Ezt követően a csendesítő konstrukciót beépítjük a pRok2 növényi transzformációs vektorba.

A klónozó vektorba beépített csendesítő szakaszokat XhoI-KpnI helyre beépítettük a pHannibal vektorba (szensz konstrukciók), majd második lépésben ugyanezeket a szakaszokat ellentétes orientációban is beépítettük a pHannibal vektor Pdk intronjának másik oldalára Call-BamHI helyre. Az elkészült konstrukciókat először a pRok2 transzformációs vektorba terveztük beépíteni SacI-BamHI helyre. Mivel azonban az „inverted repeat” konstrukciók a pRok2-ben instabilnak bizonyultak, a bináris vektorba történő átvitel nem volt sikeres. Ezért beszereztük a pART27 bináris vektort, amelybe a *NotI* helyre átvihető a teljes kazetta a pHannibal 35S promotérével és OCS terminátorával. Az elkészült konstrukciókat restrikciós analízissel ellenőriztük, majd az *Escherchia coli* LE392 törzsbe transzformáltuk. A vektor plazmidot pRK2013 segítségével háromszülős keresztezéssel vittük át *E. coli*-ből az *A. tumefaciens* EHA105 törzsbe. A transzkonjugáns telepeket 0,5% szacharózzal kiegészített rifamycin+spectinomycin/streptomycin tartalmú minimál táptalajon szelektáltuk. A szelektált telepek azonosságát az *A. tumefaciens*-re specifikus 3-ketolaktóz teszttel ellenőriztük. Először a VvVip1 gén csendesítéséhez hoztunk létre egy vektor konstrukciót. A pTi eredetű, T-DNS nélküli („helper”) plazmid jelenlétét a *virC* génre specifikus VCF/VCR, a vektor plazmidok jelenlétét pedig az *nptII* és a *Vip1asi* génekre specifikus primerekkel ellenőriztük. A kapott törzseket az EHA105(pART27), illetve EHA105(pART27::Vip1asi) jelölésekkel láttunk el.

A további gének csendesítő konstrukciói azonban – feltételezhetően az „inverted repeat” jelleg miatt – rendkívül instabilnak bizonyultak. A klónozási munka felgyorsítása érdekében ezért stratégiát váltottunk és az összes (összesen hét, ld. alább) csendesítő konstrukciót elkészítettük a pRK2 alapú pRNAiGG vektorban, melyet pályázatunk beadása után közöltek (Yan et al. 2012). Ez a rendszer a II-es típusú restrikciós endonukleázok (jelen esetben *BsaI*) előnyét kihasználva egyetlen közös emésztési/ligálási lépésben lehetővé teszi az „inverted repeat” konstrukció elkészítését közvetlenül bináris rendszerben (Yan et al. 2012). A csendesítés szempontjából

a stratégia változatlan volt: a két ellentétes orientációjú szakaszt egy növényi (Pdk) intron két oldalára építjük be ezzel segítve a hatékony kisRNS érést. A Pdk intronba épített klóramfenikol rezisztencia gén a ligálás után biztosítja a helyes konstrukciók (szensz-intron-antiszensz) szelekcióját. A fenti módon a megfelelő *BsaI* klónozó helyet és UTR szekvenciákat tartalmazó primerek felhasználásával (2. táblázat) elkészítettük a pRNAiGG::Vip1si, pRNAiGG::Rtnl2si, pRNAiGG::Rab8si, pRNAiGG::Hta2si, pRNAiGG::Hta10si, pRNAi::Sgt1si és pRNAiGG::Skp1si konstrukciókat (összesen hét kombináció), melyeket az *Escherichia coli* DH5 α törzsbe transzformáltunk. Ezek közül a Vip1a, Rab8a, Hta2 és Hta10 kifejeződésének növekedését szőlőben agrobaktérium fertőzésre bizonyítottuk (ld. 3. pont és Deák et al. 2013).

Az pRNAiGG rendszerben elkészített konstrukciókban a Pdk intron jelenlétét a rajta elhelyezkedő rezisztencia gén jelenléte (pozitív szelekció), míg az intron mindkét oldalára történő beépülést a kieső CcdB toxin hiánya (negatív szelekció) biztosítja. A plazmid DNS-t baktérium szuszpenzióból izoláltuk, majd a konstrukciók megfelelő beépülését a fent leírtakhoz hasonlóan restriktív emésztéssel (*BgIII* és *PstI* enzimek) ellenőriztük. A *PstI* restriktív kép csupán a beépülés tényét, míg a *BgIII* restriktív emésztés a Pdk intron jelenlétét továbbá visszaépülésének irányát is megmutatja. Az érzékeny szelekciós rendszernek köszönhetően a kontroll emésztések során minden vizsgált telep pozitívnek bizonyult. Mivel a szekvenáláson az azonosítást a pJET vektorban előzőleg ellenőriztük, a konstrukció megfelelő felépítését pedig restriktív emésztéssel igazoltuk, a csendesítő konstrukciókat tovább nem ellenőriztük ismételt szekvenálással.

Elméletileg a fordított ismétlődő szakaszokat tartalmazó szekvenciák kimutatásához a forward primer önmagában elég lenne (13. ábra). Figyelembe véve, hogy a létrehozott konstrukciók fordított irányultságú ismétlődő szakaszokat tartalmaznak, ezért az előremutató indító szekvencia ("forward primer") a másik szálon elvileg visszafelé irányuló indító szekvenciaként ("reverz primer") működik, közrefogva a "gén→intron←nég" szakaszt. Tehát egy szimpla forward primerrel kapott amplifikáció feltételezésünk szerint már önmagában igazolhatja a konstrukciók szerkezetének helyességét. Kísérleteinkben ez sajnos egyszerű *Taq* polimerázzal nem működött reprodukálhatóan, feltehetően az átírandó szakasz nagy mérete miatt. Phire *Taq* polimerázzal (Thermo Scientific) viszont valamennyi vizsgált konstrukciót (Kupi et al. 2014) sikerült felszaporítanunk (14. ábra), ami csak akkor lehetséges, ha ténylegesen „inverted repeat” szekvenciákat kaptunk. Ezzel egy egyszerű módszert dolgoztunk ki a csendesítő génkonstrukcióink ellenőrzésére.

Szülő transzformációhoz a megfelelő *Agrobacterium*/vektor kombinációkat alapvetően a fent leírtak szerint hoztuk létre. A hét konstrukciót és az üres vektort az *E. coli* DH5 α -ból a pRK2013 felhasználásával triparental mating-gel vittünk át a pTiBo542 alapú helper plazmidot tartalmazó *A. tumefaciens* EHA105 és a pTiC58 alapú helper plazmidot tartalmazó *A. tumefaciens* MOG301 törzsekbe (összesen 16 kombináció). Az előbbi elsősorban az észak-amerikai eredetű alanyfajták (pl. az általunk is használt 'Richter 110', ld. alább), az utóbbi pedig inkább az európai (*Vitis vinifera*) szőlőfajták transzformációjához hatékony (Szegedi et al. 2014). A transzkonjugánsokat rifampicin/kanamicin tartalmú minimál táptalajon szelektáltuk, azonosságukat többszöri tisztítás után 3-ketolaktóz teszttel ellenőriztük. A pTi és a vektor plazmidok jelenlétét plazmid gyorstesztel és/vagy PCR-el ellenőriztük. Ez utóbbihoz a *virC* és *virD2* (pTi), valamint az *nptII* és a klónozott génekre specifikus primereket használtunk (3. táblázat).

A 7. eredményeiből megjelent közlemény: Kupi (2014) *Acta Biol Szeged* 58: 65-68.

8.) Csendesítő konstrukciók tesztelése kevert fertőzésekkel

A várhatóan nagyszámú transzgenikus vonal miatt hasznos lenne egy gyors előszűrés a transzformációval szemben ellenálló vonalak azonosítására. Ezért először *in vitro* szárszegment tesztben (szőlőfajta: 'Arany Sárfehér') kevert (csendesítő konstrukció + patogén agrobaktérium) fertőzéssel vizsgáltuk, hogy a létrehozott csendesítő konstrukciók gátolják-e a tumorképződést szőlőn. A hét csendesítő konstrukció és a kontrollként használt pRNAiGG (üres vektor) MOG301-ben voltak, patogén (tumorképző) törzsként pedig az *A. tumefaciens* C58-at használtuk, mivel a szőlőn domináns *A. vitis* nem okoz tumort *in vitro* szárszegmenteken (Szegedi et al. 2014). A csendesítő konstrukciókkal 20 órával a patogén törzs előtt végeztük a fertőzést, hogy ezek a gének már működjenek, amikor a második fertőzésre használt tumorképző C58 törzs megkezdte a transzformációt. Három hét elteltével C58-al kokultivált szárszegmentek mindegyikén kaptunk tumort, míg a nem-kokultivált kontrollon nem volt tumorképződés. Meglepő módon az összes kombinált fertőzés esetében, beleértve az üres vektort is, csupán a szárszegmentek (kísérletenként 25-30 db) 15-30%-án kaptunk tumort (15. ábra), de ez a gátlás nem volt olyan erős, mint az *A. vitis* S4 esetében (ld. 5. pont és 9. ábra). A kalluszerű szövetek tumoros jellegét a nopalinnal kimutatásával bizonyítottuk. Mivel az üres vektor a csendesítő konstrukciókhoz hasonló mértékben gátolta a tumorképződést, feltételezhető, hogy az előfertőzés a felhasznált törzstől függetlenül gátolja a második fertőzést. Ennek oka lehet, hogy az első fertőzéshez használt törzs telíti a növényi sejtfalakat (ott nagyon gyorsan biofilmet képez), vagy valamilyen védekezési reakciót indukál. Így a második lépcsőben használt tumorképző törzs már nem tudott transzformálni. Korábban több növényfajon (alma gyökér, sárgarépa korong, kalanchoe szár) végeztek hasonló, de sikeres gyorsteszteket izolált növényi részekben kevert fertőzéssel csendesítő génkonstrukciókkal (Lee et al. 2003, Viss et al. 2003). A következő lépésben valamennyi kombinációval (hét csendesítő + üres vektor) elvégeztük a kísérleteket intakt *in vitro* 'Richter 110' növényeken,

de már a csendesítő és a tumorképző törzsekkel egyidejűleg fertőztünk. Itt minden esetben a kontrollhoz hasonló (C58 egyedül) tumorképződést kaptunk. Végül harmadik próbálkozásként 'Pinot noir' és 'Richter 110' szőlőfajtákon valamennyi konstrukció felhasználásával megismételtük a tesztelést üvegházi (teljes) növényeken is. Itt szintén hasonló eredményeket kaptunk, mint az intakt *in vitro* 'Richter 110'-en. Tehát a létrehozott csendesítő konstrukciók hatását a tumorképződésre szőlőn csak teljes, intakt transzformált növényeken tudjuk vizsgálni, ami nagyszámú kombináció esetén jelentős többletmunkát okoz.

9.) Szőlő transzformáció csendesítő konstrukciókkal

A *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris* cv. 'Richter 110' embriogén kalluszok transzformációjához kezdetben valamennyi létrehozott, *A. tumefaciens* EHA105-ben lévő csendesítő konstrukciót felhasználtunk. Ennek megfelelően az "üres" pART27 és pRNAiGG vektorokkal, a szintén kontrollként használt (agrobaktérium fertőzésre expressziós választ nem adó) pRNAiGG::Rtnl2si konstrukcióval, valamint a pART27::Vip1asi-t, és a további hat pRNAiGG alapú konstrukciókkal kezdtük el a transzformációt. A transzformáláshoz rifamicin és spektinomycin (pART27) vagy rifampicin és kanamicin (pRNAiGG) tartalmú LB tápoldatban felszaporítottuk az agrobaktérium törzseket, majd az embriogén kalluszokat ½MS táptalajon 2 napig kokultiváltuk az agrobaktérium sejtszuszpenzióval. A baktérium eliminálásához a kalluszokat antibiotikum-tartalmú (cefotaxime, carbenicillin) ½MS-táptalajra raktuk át, melyen a további fenntartást is végezzük. Kontrollként nem transzformált kalluszokat is kioltottuk antibiotikumos (szelektációs ágenszt tartalmazó) MSEM táptalajra. Az agrobaktériumos kezelést követően a kalluszokat a visszafertőződés elkerülése végett továbbra is antibiotikumos táptalajon tartottuk fenn. A szelektációs táptalajon regenerált embriókat (0,5-1 cm) fényszobában neveltük tovább (16. ábra).

A pArt27 plazmiddal végzett transzformációs kísérletben a regeneráció sikertelennek bizonyult, így a továbbiakban csak a pRNAiGG plazmidban klónozott konstrukciókkal végzett kezelésekből származó kallusztenyészeteket tartottuk fenn regenerációs táptalajon. A regeneráció során megjelentek a zöld hajtások, ám több konstrukciónál a hajtások feketedését tapasztaltuk. Az újonnan transzformált kalluszokból 3-4 hónap után embriók fejlődtek, melyeket fényszobában nevelünk tovább. Az egy éven keresztül szelektációs táptalajon passzált kalluszok fenntartását antibiotikum-mentes ½MS táptalajon folytattuk. A transzformált kalluszokon megjelentek leveles hajtásokat a továbbiakban antibiotikum-mentes ½MS táptalajon, *in vitro* tenyészetekben tartottuk fenn.

10.) A szelektált vonalak tesztelése

Munkánk során összesen 41, *in vitro* tenyészetben folyamatosan fenntartható független transzformált vonalat tudunk szelektálni a következő konstrukciókkal: RNAiGG (kontroll): nyolc, Sgt1: három, Skp1: öt, Rab8a: öt, Hta10: egy és Hta2: 19. A Vip1a és az Rtnl2 konstrukciókkal a kezdeti sikeres regeneráció után nem kaptunk fenntartható transzformált vonalakat. Feltehető, hogy ezekkel, illetve a kisszámú független transzformált vonalat produkáló konstrukciókkal esszenciális géneket csendesítettünk. Annak vizsgálatára, hogy az izolált vonalak valóban transzformáltak, a 33 független feltételezett transzformált vonalból, illetve a kontroll 'Richter 110'-ből egy módosított CTAB módszerrel (Xu et al. 2004) DNS-t izoláltunk. A módszer lényege, hogy a CTAB-lízis előtt a növényi szövetet Tris/EDTA/glükóz pufferben homogenizáljuk (mosás), majd centrifugálás után a felülúszót az oldható keményítővel és fenolvegyletekkel leöntjük. Ezt követően a leülepitett növényi mintát lízáljuk, így lényegesen tisztább nukleinsav preparátumot kapunk. Az izolált DNS minőségét és mennyiségét először agaróz gélen ellenőriztük. Ezt követően egy kontroll kísérletben valamennyi mintát teszteltünk PCR-el egy háztartási génre (18SrRNS) specifikus primerpárral. Valamennyi minta pozitív reakciót adott, tehát a további vizsgálatokra alkalmasak voltak. A következő kontroll kísérletben a *virC*, vagy a *virH2* génre specifikus primerekkel ellenőriztük, hogy a növényi DNS mintáink nem tartalmaznak szennyeződésként *Agrobacterium* DNS-t. Valamennyi minta negatívnak bizonyult. Végül a két kontroll kísérlet után az *npII* génre specifikus primerpárral bizonyítottuk, hogy a szelektált vonalak tartalmazzák a beépítendő konstrukciót (17. ábra). A felhasznált indítószekvenciákat (primereket) a 3. táblázat tartalmazza.

A 33 transzgenikus vonalból, valamint a kontrollként használt nem-transzformált 'Richter110' növényekből összesen 66 *in vitro* egyedet edzettünk meg fényszobai/üvegházi körülményekre. Ezek fiatal, fejlődő szárait az *A. tumefaciens* C58 törzssel fertőztük. Az eredményeket 6 hét után értékeltük. A tesztelt növények mindegyikén kaptunk tumort, hasonlóan a vad-típusú 'Richter 110'-hez és az „üres” pRNAiGG vektorral transzformált növényekhez. Tehát a tesztelt konstrukciók nem indukáltak rezisztenciát a golyvósodással szemben. Ez különösen meglepő a Hta2 transzformások esetében, mivel ezzel a konstrukcióval viszonylag elfogadható számú (17) vonalak kaptunk, és a Hta2 agrobaktériumos transzformációban betöltött szerepét még élesztőkben is igazolták (Wolterink-van Loo et al. 2015).

A transzformáns növények agrobaktérium fogékonyságának alapvetően két magyarázata lehet: egyrészt ha a csendesítés hatékony, de a kiválasztott célgén az előzetes vizsgálatok ellenére sem vesz részt a kórfolyamatban (esetleg a csendesített gén termékének hiányát a család egy másik fehérjéje komplementálja), vagy ha a csendesítés nem volt elég hatékony. RNS csendesítésen alapuló vonalak csak a legkritikább esetekben bizonyulnak knock out mutáns értékűnek, a vonalak nagy része kisebb-nagyobb hatékonysággal csendesíti a célgént. Az eredeti koncepciónk az volt, hogy a konstrukciók előzetes ellenőrzését, majd a beépülés tényének

igazolását követően a csendesítés hatékonyságát/mértékét csak a toleráns fenotípust adó vonalakon vizsgáljuk. Annak alapján, hogy az intakt növényé nevelhető vonalak mindegyike fogékonyak bizonyult, felmerült a kérdés, hogy vajon sikeres volt-e a gének csendesítése a túlélő vonalakban? Kiválasztott vonalakon qPCR technikával ellenőriztük a célgének relatív expressziós szintjét és nem tapasztaltunk különbséget a transzformáns és vad típusú 'Richter 110' vonalak között. Mivel a konstrukciókat gondosan ellenőriztük, a beépülést igazoltuk, az alkalmazott stratégia (hairpin alapú inverted repeat konstrukció, 3' UTR célzása) pedig igazoltan hatékony (Wesley et al 2001.), feltételezzük, hogy a hatékony csendesítést mutató vonalak életképessége csökkent le. Emiatt a regenerációt követően csak azok a vonalak maradtak fent, amelyekben a csendesítés valamely oknál fogva nem működött. Természetesen ideális esetben jó lenne ellenőrizni, hogy az adott célgénről (elsősorban annak 3' UTR szakaszáról) érik-e kisRNS frakció. Erre azonban idő és kézből lévő módszertan hiányában jelen projekt keretein belül nem volt lehetőségünk. Ráadásul egy esetleges negatív válasz (vagyis a kisRNS-ek hiánya) még mindig nem segítene eldönteni azt, hogy a konstrukciók nem megfelelőek, vagy a hatékonyan csendesítő vonalak életképtelenek?

A fenti alapján a projektben felvázolt koncepció: non-host típusú rezisztencia kialakítása az agrobaktérium-szőlő kórfolyamatban szerepet játszó növényi gének csendesítésével a gyakorlatban nem kivitelezhető.

11.) Agrobaktériumos tumorképződés gátlása onkogén csendesítéssel

A pályázat fő kutatási célkitűzése a gazdanövény agrobaktériumos transzformációban közreműködő génjeinek csendesítésén alapuló rezisztencia kiváltása. A kérdést megközelítettük a patogén oldaláról is, vagyis a témához kapcsolódó kísérletekben vizsgáltuk az agrobaktérium onkogének lehetséges csendesítésének hatását is a tumorképződésre. Ehhez a pJP17 plazmidot használtuk fel, mely *A. tumefaciens* pTiA6 eredetű, egymással komplementer szensz és antiszensz szekvenciákat tartalmaz (Viss et al. 2003). Huszonegy transzformált 'Richter 110' vonalat szelektáltunk, melyek közül nyolc volt rezisztens az A348(=pTiA6) által indukált tumorképzésre. Ugyanakkor az *A. tumefaciens* C58 és A281, valamint a vizsgált három *A. vitis* törzsekre nem, vagy csak egy-két kivételes esetben kaptunk ellenálló vonalakat (18. ábra). Az *A. vitis* törzsek onkogénjeinek szekvenciái jelentős mértékben eltérnek az *A. tumefaciens*-től, így érthető, hogy az *A. tumefaciens* pTiA6 eredetű konstrukció nem volt hatékony. Ugyanakkor a három *A. tumefaciens* törzs ugyanazzal a kromoszómális háttérrel (C58) rendelkezik és az onkogének szekvenciái is nagyfokú hasonlóságot mutatnak, így feltételezhető, hogy a szekvencia hasonlóságon kívül a pTi plazmid valamelyik T-DNS-en kívüli régiója jelentős mértékben befolyásolja a csendesítés hatékonyságát. Összefoglalva megállapítható, hogy az agrobaktérium törzsek nagyfokú genetikai sokfélesége miatt a patogén onkogénjeinek gátlására irányuló stratégiák egy-egy *Agrobacterium* törzs T-DNS-ére tervezett csendesítő konstrukciójával nem alkalmasak a golyvásodással szembeni széleskörű rezisztencia kialakítására. A probléma megoldása különböző törzsek onkogénjeire, vagy rövidebb konzervált szakaszokra tervezett kombinált csendesítő konstrukciók együttes alkalmazásával lenne megoldható.

A 11. eredményeiből megjelent közlemény: Galambos et al. (2013) *Plant Cell Rep* 32: 1751-1757.

12.) A pályázat témájához közvetlenül kapcsolódó további eredmények

12.1. A VIP1 kölcsönhatások vizsgálata

A globális időjárás-változás miatt megnőtt az abiotikus stresszhatásokkal szemben ellenálló fajták használatának a jelentősége. Ezért a csendesítésre kijelölt gének közül kiemelt figyelmet fordítottunk az agrobaktérium VirE2 proteinjével kölcsönhatásba lépő VIP1-re (Tzfira et al. 2001), mivel a VIP1 fehérje a növény-patogén kölcsönhatás mellett feltehetően fontos szerepet játszik az abiotikus stresszválasz kialakításában is (Lacroix, Citovsky 2013, Liu et al. 2010). Korábban kimutattuk, hogy a VIP1 egyik szőlő homológja transzkripció szintű választ ad az agrobaktériumos fertőzésre. Ezután funkcionális vizsgálatokkal is tervezzük igazolni a szőlő VIP1 génjelölt ortológ szerepét.

A már korábban elkészített csendesítő konstrukciók mellett létrehoztunk 2x35S promóterrel meghajtott túltermelő, valamint saját promóterrel meghajtott GFP-fúziós konstrukciókat (ez utóbbit a sejten belüli lokalizáció vizsgálatához). A transzformáns vonalak részletes jellemzése alapján következtethetünk a fehérje biotikus és abiotikus stresszválaszban betöltött szerepére. A transzformáns növények mellett vizsgáljuk egyrészt a fehérje funkcióját transziens expresszió során heterológ rendszerben, valamint annak VirE2 kötő képességét. A VirE2 kötő képességet első lépésben koimmunoprecipitációs teszttel vizsgáltuk, melynek során a VirE2 és VIP1 fehérjéket epitóp Tag-gel (Myc és Ha) fuzionáltuk és együtt expresszáltuk őket dohány növényekben. Az expresszióhoz transziens rendszert, agrobaktérium infiltrálást használtunk. Az immunoprecipitáció során az infiltrált levelekből feltárt fehérje kivonatot anti-Ha agaróz gyöngyökhöz adtuk. Az interakciót Western hibridizációval vizsgáltuk monoklonális Ha és Myc antitestekkel. Amennyiben a Ha antitest hibridizálás során megkapjuk a várt jelet, úgy a Ha tag-gel ellátott VIP1 fehérje kötődött az agaróz gyöngyökhöz. Ha a Myc

ellenanyagos hibridizálás során is megkapjuk a várt jelet előhíváskor, akkor igazolást nyer, hogy a VirE2 fehérje valóban kölcsönhatásba lép a VIP1 fehérjével.

A koimmunoprecipitációs kísérletek nem igazolták a szőlő VIP1 génjelölt és a VirE2 fehérje közötti kölcsönhatást, mely összhangban van Gelvin csoportjának közelmúltbeli eredményeivel (Shi et al. 2014). Ennek oka lehet egyrészt a kölcsönhatás hiánya, másrészt a kölcsönhatás vártnál gyengébb mivolta. A két fehérje közötti kölcsönhatás további vizsgálatára tervezzük az interakció jellemzését fluoreszcens komplementációs rendszerben, amely a koimmunoprecipitációnál érzékenyebb módszer és gyengébb kölcsönhatások kimutatására is alkalmas.

12.2. Optimális táptalajok baktériumtenyészetekhez

Pályázatunk megvalósítása során különböző baktériumtörzseket (*A. tumefaciens*, *A. vitis*, *E. coli*) használtunk. Fontos, hogy ezek -80 °C-on történő tartós tárolásán kívül a napi munkához való fenntartásához és tenyésztéséhez is optimális táptalajjal rendelkezünk. Megfigyeléseink alapján a baktériumokhoz általánosan használt, szerves komponensekben rendkívül gazdag, de inorganikus elemekben szegény Luria-Bertani (LB) és glükóz-élesztőkivonat (GY) táptalajokat erre nem találtuk alkalmasnak. Ezért a fenti két táptalajt kiegészítettük dikálium-hidrogén-foszfáttal, magnézium-szulfáttal, vas-szulfáttal és egyéb mikroelemekkel (Mn, Zn, Co és Mo). Ezek közül a foszfát közismerten a nukleinsavak és az NTP-k építőköve, a kationok pedig a transzport folyamatokban és különböző enzimek kofaktoraiként fontosak. Az így összeállított táptalajokon (ferde agar) három ismétlésben vizsgáltuk a kísérletekbe bevont 15 különböző baktériumtörzs életképességét, illetve eltarthatóságát 4°C-on, három ismétlésben. Ennek során három havonta végeztünk kitenyésztést a tárolt tenyészetekről. A munkánk során használt törzsek közül mind az *E. coli* LE392 és DH5 α , mind az *A. tumefaciens* C58 és *A. vitis* Tm4, AT1 és S4 törzsek jobban fejlődtek és tovább eltarthatóak voltak, mint az eredeti táptalajokon. Az alaptáptalajokon az eltarthatóság kb. 6 hónap volt (19. ábra), míg a kiegészített táptalajon ez 12 hónapra nőtt. Eredményünk az agrobaktériummal kapcsolatos munkákon kívül más területeken is alkalmazható lehet, pl. baktériumpopulációk izolálásához különböző (élelmiszeripari, növényi, talaj, víz) mintákból diagnosztikai vagy kutatási célokra.

Publikáció: előkészületben (tervezett beküldés: Acta Biologica Szegediensis)

12.3. A Chelex-100 alkalmazása szőlő DNS kivonásra

A hagyományos DNS kivonási módszerek nagyon összetettek (homogenizálás, sejtlízis, szerves extrakció, nukleinsav kicsapás, mosás, szárítás és végül visszaoldás), és a többszöri mintaátvitel miatt anyag és költségigényesek. A különböző, de viszonylag drága készletekkel (pl. Qiagen kit) ez a munka némileg egyszerűbbé válik, de a napi feldolgozható mintaszám így is alacsony (kb. 24). Ezért kipróbáltuk a bűnügyi diagnosztikában már régóta használt Chelex-100-at (egy enyhén alkalikus kémhatású erős kelátképző gyanta, Walsh et al. 1991), melynek növényi alkalmazására csupán egyetlen adatot találtunk (HwangBo et al. 2010). Munkánkhoz *in vitro* szőlő növények ('Arany Sárfehér', 'Kövidinka' és 'Richter 110') leveleit használtuk. A Chelex-100-ból 10%-os emulziót készítettünk steril desztillált vízben, ebből folyamatos keverés mellett 300 μ l-nyi mennyiségeket szétmértünk Eppendorf csövekbe. Ehhez adtunk 4-4 ismétlésben 20, 10, vagy 5 mg intakt (nem roncsolt) levélkorongot, majd a mintákat rendszeres keverés mellett 10 percig melegítettük 90 °C-on. Centrifugálás után a felülúszóból 1-1 μ l-t használtunk a 18SrRNS génre specifikus primerekkel végzett PCR-hez (reakciótérfogat: 25 μ l). Valamennyi tesztben, még az 5 mg/300 μ l kombinációban is, pozitív eredményeket kaptunk (20. ábra). Üvegházi növények levélmintáinak esetében viszont, összhangban a korábban közöltekkel (HwangBo et al. 2010), szükség volt homogenizálásra. A következő lépésben 4-4 különböző *A. tumefaciens* és *A. vitis* törzs szuszpenzióival (kb. 5×10^7 sejt/ml) is elvégeztük a kísérletet azonos körülmények között, majd a felülúszót PCR-el teszteltük a *virH2* (*A. tumefaciens*), vagy a poligalakturonáz (*A. vitis*) génre specifikus primerekkel (3. táblázat). Itt is minden esetben specifikus pozitív reakciót kaptunk. Eredményeink alapján a Chelex-100-alapú DNS kivonás egy rendkívül egyszerű és viszonylag olcsó módszer lehet szőlő genetikai vizsgálatokra, beépített gének jelenlétének a kimutatására, valamint (mivel az agrobaktériumból is kivonta a DNS-t) növény-egészségügyi diagnosztikai vizsgálatokra is.

13.) A pályázat ideje alatt végzett egyéb szőlő/Agrobacterium témához kapcsolódó munkák, melyekhez a támogatás közvetve hozzájárult

A baktériumok közötti kommunikáció („quorum sensing”) számos baktériumos kórfolyamatban játszik meghatározó szerepet, mint a humán betegségeknél, vagy a növénykórtan területén (pl. biofilm képződés, konjugatív plazmid átvitel). *Agrobacterium* által indukált szőlő tumorok baktérium populációinak ilyen irányú vizsgálata során izoláltunk egy *Sphingomonadaceae* családba tartozó baktériumot, mely orvosi mikrobiológiai kísérletekben is a *Chromobacterium violaceum* CV26 szenzor törzsszel kiváló modell törzsnek bizonyult az

interbakteriális kommunikáció gátlásának tesztelésére. Megjelent közlemény: Varga et al (2012) *In Vivo* 26: 277-285.

A tumorképzésért közvetlenül felelős onkogének, valamint az opin-szintézis gének evolúciós eredete nem ismert. A 80-s évek elején White és mtsi a *Nicotiana glaucab*ban találtak a pRiA4 T-DNS-el nagyfokú hasonlóságot mutató géneket. Később számos más *Nicotiana* és *Linaria* fajban írtak le pRi szekvenciákat (cT-DNS). Feltehetően ezek ősi transzformációs eseményekből származnak, és jelenlétük elősegítette a transzformált növények ökológiai adaptációját. A cT-DNS-ek evolúciós markerként is használhatók a *Nicotiana* fajok evolúciójának a nyomonkövetéséhez. A Léon Otten (CNRS, Institute of Plant Molecular Biology, Strasbourg) és csoportja által végzett munkához a cDNS-ek kifejeződésének tesztelésével (opin kimutatás) kapcsolódtunk. Megjelent közlemény: Chen K et al (2014) *Plant J* 80: 669-682.

A szőlő szaporítóanyaggal terjedő betegségeiről, ezen belül az agrobaktériumos golyvásodásról egy könyvfejezet írásában vettünk részt, mely a Nova Science kiadásban az USA-ban jelent meg. Megjelent közlemény: Bisztray et al (2012) *Grapevines: Varieties, Cultivation and Management*, Nova Science Publishers, Inc.,

14.) A pályázatban kitűzött célok, a megvalósítás során elért új eredmények és azok hasznosíthatósága

Kutatási célunk volt, hogy:

- Az eddig *Arabidopsis*ban és dohányban már azonosított, agrobaktériumos transzformációban közreműködő géneket DNS szekvencia homológia alapján *in silico* azonosítsuk szőlőben (cv. 'Pinot noir').
- Vizsgáljuk az azonosított gének kifejeződésének változását *Agrobacterium*-fertőzést követően.
- A szőlő genetikai transzformációja céljából embriogén kallsztyénészeteiket hozzuk létre a *Vitis berlandieri* x *V. rupestris* cv. 'Richter 110' szőlőfajta portoktenyészetéből.
- Az *Agrobacterium*-fertőzés által indukált gének (négyet terveztünk) fordított ismétlődő szakaszaival csendesítő konstrukciókat készítünk szőlő embriogén kallsztyénészeteik transzformációjához.
- Ellenőrizzük a csendesítő konstrukciók elkészítéséhez használt, a 'Pinot noir' genomon azonosított gének szekvenciáit a transzformációhoz használt 'Richter 110'-ben, jelenlétüket PCR-el más szőlőfajtákban.
- A létrehozott konstrukciókkal transzfomáljuk a 'Richter 110' portoktenyészetéből létrehozott embriogén kallsz sejteket. Ezekből növényeket regenerálunk.
- A szelektált vonalakat valódi transzformált jellegét hagyományos PCR-el, a csendesítés hatékonyságát pedig cDNS-ből kiindulva qRT-PCR-el ellenőrizzük.
- A transzformált növényeket akklimatizáljuk üvegházi körülményekre, majd mesterséges fertőzéssel ellenőrizzük ezek agrobaktérium törzsekkel szembeni fogékonyságát.

Elért eredmények és azok hasznosíthatósága:

- Munkánk során szekvencia homológia alapján összesen hét génre végeztünk *in silico* tblastn keresést a 'Pinot noir' genomon. Ezeknek csaknem mindegyike nagyobb számú tagból (homológ szekvenciából) álló géncsaládokat képezett. Így például a CslA09 családban négy tagot, a BTI családban 57 tagot, a Rab8a családban 75 (!!!) tagot, a Vip1 családban 22 tagot, 16 H2A hiszton homológot, az Skp1 családban nyolc tagot és az Sgt1 homológok közül 30 tagot azonosítottunk.
- A fenti géncsaládok összesen 17 tagjának a kifejeződésének változását vizsgáltuk szőlőben agrobaktérium fertőzést követően. Az Rtnl2 kifejeződésben nem volt változás, de a VvRab8a, Vip1a, VvHta10 és VvHta2 gének expressziója szignifikáns növekedést mutatott.
- Számos szőlőfajta portokjaiból indítottunk embriogén tenyészetet. Ezek közül a 'Richter 110' fajta tenyészetek mutatták a legintenzívebb növekedést, ezért - a munkatervnek megfelelően - ezt használtuk transzformációra. Az embriogén tenyészetek intenzív szaporítására és fenntartására az eddigi módszereknél lényegesen hatékonyabb folyadékultúrás módszert dolgoztunk ki.
- Az agrobaktériumos fertőzésre indukálódó VvRab8a, Vip1a, VvHta10 és VvHta2 génekből, kontrollként a nem-indukálódó Rtnl2-ből, valamint a kísérletekbe később bevont Sgt1 és Skp1 génekből csendesítő konstrukciókat hoztunk létre a pRNAiGG vektorban. A konstrukciók „fordított ismétlődő szakasz” jellegét új módszerként egyprimeres PCR-el is igazoltuk.
- A csendesítő konstrukciókhoz használt gének jelenlétét 12 szőlőfajtában ellenőriztük PCR-el. A transzformációhoz használt 'Richter 110' fajtában ellenőriztük a szekvenciák azonosságát.
- A létrehozott hét konstrukcióval, valamint az „üres” pRNAiGG vektorral transzfomáltuk a 'Richter 110' portoktenyészetéből létrehozott embriogén kallsztyékat. Összesen 33, *in vitro* tenyészetben fenntartható független transzformált vonalat tudtunk szelektálni a pRNAiGG (kontroll), az Sgt1, az Skp1, a Rab8a, a Hta10 és a Hta2 konstrukciókkal.

- A kanamicinen szelektált vonalakat valódi transzformált jellegét *nptII* génre specifikus primerek felhasználásával hagyományos PCR-el, a csendesítés hatékonyságát pedig egyes kiválasztott vonalakon cDNS-ből kiindulva qRT-PCR-el vizsgáltuk.
- A 33 transzformált 'Richter 110' vonal 66 egyedét edzettük üvegházi körülményekre, majd az *A. tumefaciens* C58 törzssel végzett mesterséges fertőzéssel ellenőriztük ezek golyvásodással szembeni fogékonyságát. A tervezettel ellentétben csak a C58 törzset használtuk, mivel az *A. vitis* törzsek *in vitro* rendszerben kevésbé voltak patogének. A C58 törzssel szembeni fogékonyságot „fordított” kísérletben is vizsgáltuk. Ennek során vad típusú 'Richter 110' növényeket fertőztünk egy-egy csendesítő konstrukció és a C58 keverékével. Ebben az esetben sem kaptunk tumorgátlást. Tehát az agrobaktériumos transzformációban közreműködő gazdanövény génekre tervezett csendesítő konstrukciókkal nem sikerült golyvás betegséggel szembeni rezisztenciát kiváltani szőlőben.

Terven felüli, de a pályázat témájához szorosan kapcsolódó egyéb munkák, eredmények:

- A kísérletekbe bevontuk a pályázat beadása után közölt Sgt1 és Skp1 géneket.
- Hatékony folyadékkultúrás módszert dolgoztunk ki szőlő embriogén kultúrák fenntartására és intenzív felszaporítására.
- Egy (csak előremutató) indítószekvenciával végzett PCR-el igazoltuk, hogy a csendesítésre beépített gének a pRNAiGG vektorban megfelelő orientációban vannak.
- Bizonyítottuk, hogy az agrobaktérium T-DNS onkogénjeinek csendesítésén alapuló stratégiával kiváltható rezisztencia, de ez a szekvenciák genetikai diverzitása miatt törzsspecifikus.
- Szőlő szárszegment tesztekkel bizonyítottuk, hogy a szőlőre specializálódott *A. vitis* törzsek eben az *in vitro* rendszerben nem okoznak tumort, az *A. tumefaciens* viszont igen. Sőt, az *A. vitis* S4 törzs kombinált fertőzésben teljes mértékben gátolta az *A. tumefaciens* által indukált tumorképződést.
- Vizsgáltuk a VIP1-VirE2 kölcsönhatást, melynek eredményei összhangban vannak Gelvin munkacsoportjának közelmúltban közölt eredményeivel (Shi et al. 2014).
- A használt baktériumtörzsek gyorsabb felszaporítására és aktív tenyészetben történő megbízhatóbb fenntartására inorganikus elemekkel kiegészített új táptalajkombinációkat dolgoztunk ki.
- Bizonyítottuk, hogy a Chelex-100 alkalmas szőlő és agrobaktérium DNS kivonásra PCR-hez történő alkalmazásokhoz.

Az eredmények hasznosíthatósága:

- Az általunk kidolgozott folyadékkultúrás módszer hasznos lehet az új szőlőfajták és klónok intenzív felszaporítására, illetve a szőlő vírusmentesítésére szomatikus embriókból történő regenerációval (Borrot-Fernandez et al. 2008, Gambino et al 2009).
- Az egyprimeres PCR gyors és olcsó módszer a géncsökkentésre létrehozott, fordított, ismétlődő szakaszokat tartalmazó konstrukciók helyes szerkezetének ellenőrzésére.
- A gazdanövény közreműködő génjeinek csendesítésén alapuló eljárás nem, az agrobaktérium onkogén csendesítésén alapuló módszer viszont hatékony lehet a golyvás betegséggel szembeni ellenálóképesség kialakítására.
- Az általunk bevezetett komplex táptalajok biztosítják a baktériumtörzsek gyors felszaporítását és megbízhatóbb fenntartását.
- A Chelex-100 alkalmazásával egy rendkívül egyszerű és gyors módszert vezettünk be szőlő DNS minták genetikai analizésére, mely használható lehet a növényegészségügyi diagnosztikában is, például baktériumfertőzések detektálására.

15.) Irodalom

- Albuquerque N, Petri C, Faize L, Burgos L (2012) A short-length single chimeric transgene induces simultaneous silencing of *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes and resistance to crown gall. *Plant Pathol* 61: 1073-1081.
- Anand A, Rojas CM, Tang Y, Mysore KS (2012) Several components of SKP1/Cullin/F-box E3 ubiquitin ligase complex and associated factors play a role in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *New Phytol* 195: 203-216.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes ÉA, Aragão FJL (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant-Microbe Interact* 20: 717-726.
- Borrot-Fernandez EG, Sommerbauer T, Popowich E, Scharl A, Laimer M (2009) Somatic embryogenesis from anthers of the autochthonous *Vitis vinifera* cv. Domina leads to *Arabidopsis mosaic virus*-free plants. *Eur J Plant Pathol* 124: 171-174.

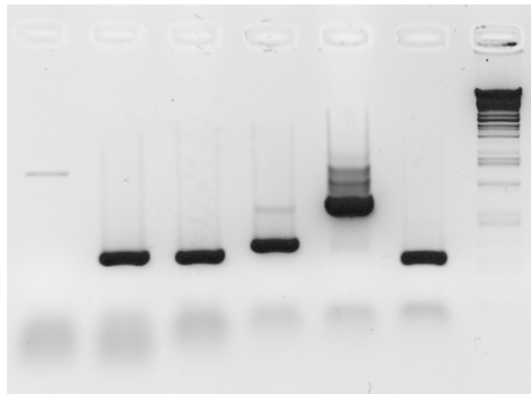
- Bourras S, Rouxel T, Meyer M (2015) *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. *Phytopathology* 105: 1288-1301.
- Burr TJ, Bazzi C, Süle S, Otten L (1998): Crown gall of grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. *Plant Dis* 82: 1288-1297.
- Cruz LF, Rupp JLS, Trick HN, Fellers JP (2014) Stable resistance to *Wheat streak mosaic virus* in wheat mediated by RNAi. *In Vitro Cell Dev Biol – Plant* 50: 665-672.
- Deák T, Kupi T, Oláh R, Lakatos L, Kemény L, Bisztray GyD, Szegedi E (2013) Candidate plant gene homologues in grapevine involved in *Agrobacterium* transformation. *Centr Eur J Biol* 8: 1001-1009.
- Escobar MA, Civerolo EL, Summerfelt KR, Dandekar AM (2001) RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13437-13442.
- Galambos A, Zok A, Kuczmog A, Oláh R, Putnoky P, Ream W, Szegedi E (2013) Silencing *Agrobacterium* oncogenes in transgenic grapevine results in strain-specific crown gall resistance. *Plant Cell Rep* 32: 1751-1757.
- Gambino G, Gribaudo I (2006): Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* 96: 1223-1229.
- Gambino G, Di Matteo D, Gribaudo I (2009) Elimination of *Grapevine fanleaf virus* from three *Vitis vinifera* cultivars by somatic embryogenesis. *Eur J Plant Pathol* 123: 57-60.
- Gelvin SB (2010) Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annu Rev Phytopathol* 48: 45-68
- Gelvin SB (2012) Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. *Front Plant Sci* 3: 52.
- Gu L, Knipple DC (2013) Recent advances in RNA interference research in insects: implications for future insect pest management strategies. *Crop Protection* 45: 36-40.
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environm Microbiol* 61: 2879-2884.
- Hoffmann B, Trinh TH, Leung J, Kondorosi A, Kondorosi E (1997) A new *Medicago truncatula* line with superior *in vitro* regeneration, transformation and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 307-315.
- HwangBo K, Son SH, Lee JS, Min SR et al. (2010) Rapid and simple method for DNA extraction from plant and algal species suitable for PCR amplification using a chelating resin Chelex 100. *Plant Biotechnol Rep* 4: 49-52.
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A et al. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-468.
- Jelly NS, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P (2012) Transient expression of artificial microRNAs targeting *Grapevine fanleaf virus* and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Res* 21: 1319-1327.
- Kado CI (1998) Origin and evolution of plasmids. *Ant Leeuwenh* 73: 117-126.
- Kado CI (2014) Historical account on gaining insight on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Microbiol* 5: 340
- Krastanova SV, Balaji V, Holden MR, Sekiya M, Xue B, Momol EA, Burr TJ (2010) Resistance to crown gall disease in transgenic grapevine rootstocks containing truncated *virE2* of *Agrobacterium*. *Transgenic Res* 19: 949-958.
- Lacroix B, Citovsky V (2013) Characterization of VIP1 activity as a transcriptional regulator *in vitro* and *in planta*. *Sci Rep* 3: 2440
- Lee H, Humann JL, Pitrak J, Cuperus JT, Parks TD, Whistler, CA, Mok MC, Ream WL (2003) Translation start sequences affecting the efficiency of silencing of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA oncogenes. *Plant Physiol* 133: 966-977.
- Liu Y, Kong X, Pan J, Li D (2010) VIP1: linking *Agrobacterium*-mediated transformation to plant immunity? *Plant Cell Rep* 29: 805-812.
- Kupi T, Deák T, Bisztray GYD, Szegedi E (2014): Detection of self-complementary inverted repeats by single forward primer driven PCR. *Acta Biol Szeged* 58: 65-68.
- Nahid N, Amin I, Briddon RW, Mansoor S (2011) RNA interference-based resistance against a legume mastrevirus. *Virology* 418: 499.
- Nester EW (2015) *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci* 5:370.
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund S (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development, *BMC Plant Biol* 6: 27.
- Salomone J-Y, Szegedi E, Cobanov P, Otten L (1998) Tartrate utilization genes promote growth of *Agrobacterium* spp. on grapevine. *Mol Plant-Microbe Interact* 11: 836-838
- Sawada H, Ieki H, Matsuda I (1995) PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environm Microbiol* 61: 828-831.

- Shi Y, Lee L-Y, Gelvin SB (2014) Is VIP1 important for *Agrobacterium*-mediated transformation? *Plant J* 79: 848–860.
- Shimizu T, Ogamino T, Hiraguri A, Nakazono-Nagaoka E et al. (2013) Strong resistance against *Rice grassy stunt virus* is induced in transgenic rice plants expressing double-stranded RNA of the viral genes for nucleocapsid or movement proteins as targets for RNA interference. *Phytopathology* 103: 513-519.
- Szegedi E (2003) Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. *Vitis* 42: 39-41.
- Szegedi E, Bottka S (2002) Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis* 41: 37-42.
- Szegedi E, Bottka S, Mikulás J, Otten L, Süle S (2005) Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis* 44: 49-54.
- Szegedi E, Deák T, Forgács I, Zok A, Oláh R (2014) *Agrobacterium vitis* strains lack tumorigenic ability on *in vitro* grown grapevine stem segments. *Vitis* 53: 147-154.
- Torregrosa L, Iocco P, Thomas MR (2002) Influence of *Agrobacterium* strain, culture medium, and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. *Am J Enol Vitic* 53: 183-190.
- Tzfira T, Citovsky V (2008) *Agrobacterium*: from biology to biotechnology, Springer Science+Business Media LLC, New York.
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V (2001) VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *EMBO J* 20: 3596-3607.
- Varga ZG, Armada A, Cerca P, Amaral L, Ahmad Subki MAAM, Savka MA, Szegedi E, Kawase M, Motohashi N, Molnár J (2012) Inhibition of quorum sensing and efflux pump system by trifluoromethyl ketone proton pump inhibitors. *In Vivo* 26: 277-285.
- Viss WJ, Pitrak J, Humann J, Cook M, Driver J, Ream W (2003) Crown gall-resistant transgenic apple trees that silence *Agrobacterium tumefaciens* oncogenes. *Mol Breed* 12: 283-295.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA et al. (2001) Construct design for efficient, effective and high throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27: 581-590.
- Wolterink-van Loo S, Escamilla Ayala AA, Hooykaas PJJ, Paul H. van Heusden PH (2015) Interaction of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VirD2 with histones. *Microbiology* 161:401-410
- Xu Q, Wen X, Deng X (2004) A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburghii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Mol Biol Rep* 22: 301a-301g.
- Yan P, Shen W, Gao XZ, Li X, Zhou P, Duan J (2012) High-throughput construction of intron-containing hairpin RNA vectors for RNAi in plants. *PloS ONE* 7: e38186.
- Zaltsman A, Krichevsky A, Loyter A, Citovsky V (2010) *Agrobacterium* induces expression of a host F-box protein required for tumorigenicity. *Cell Host & Microbe* 7: 197-209.
- Zaltsman A, Lacroix B, Gafni Y, Citovsky V (2013) Disassembly of synthetic *Agrobacterium* T-DNA-protein complexes via the host SCF^{VBFB} ubiquitin–ligase complex pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 169-174.

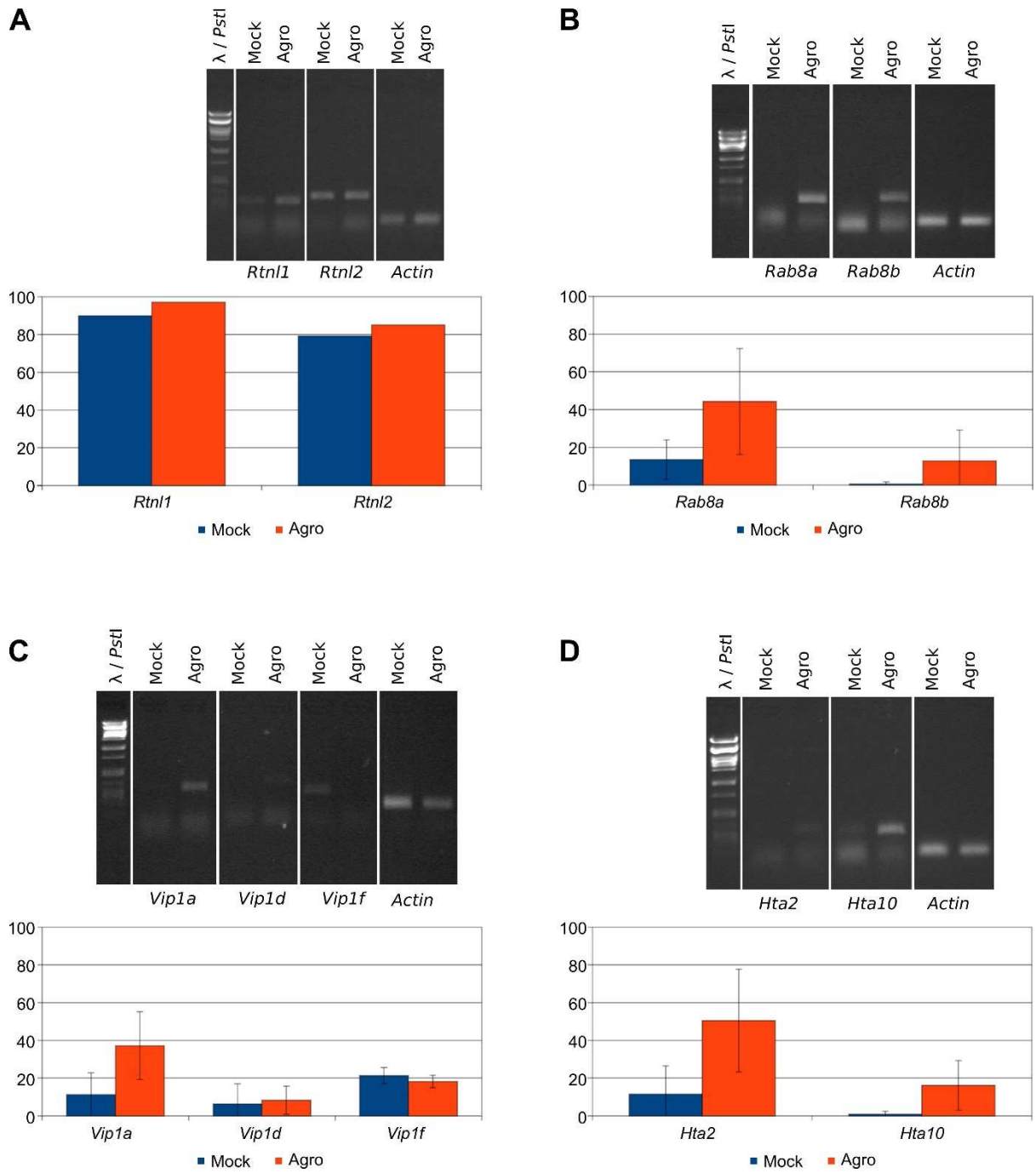
Ábrák



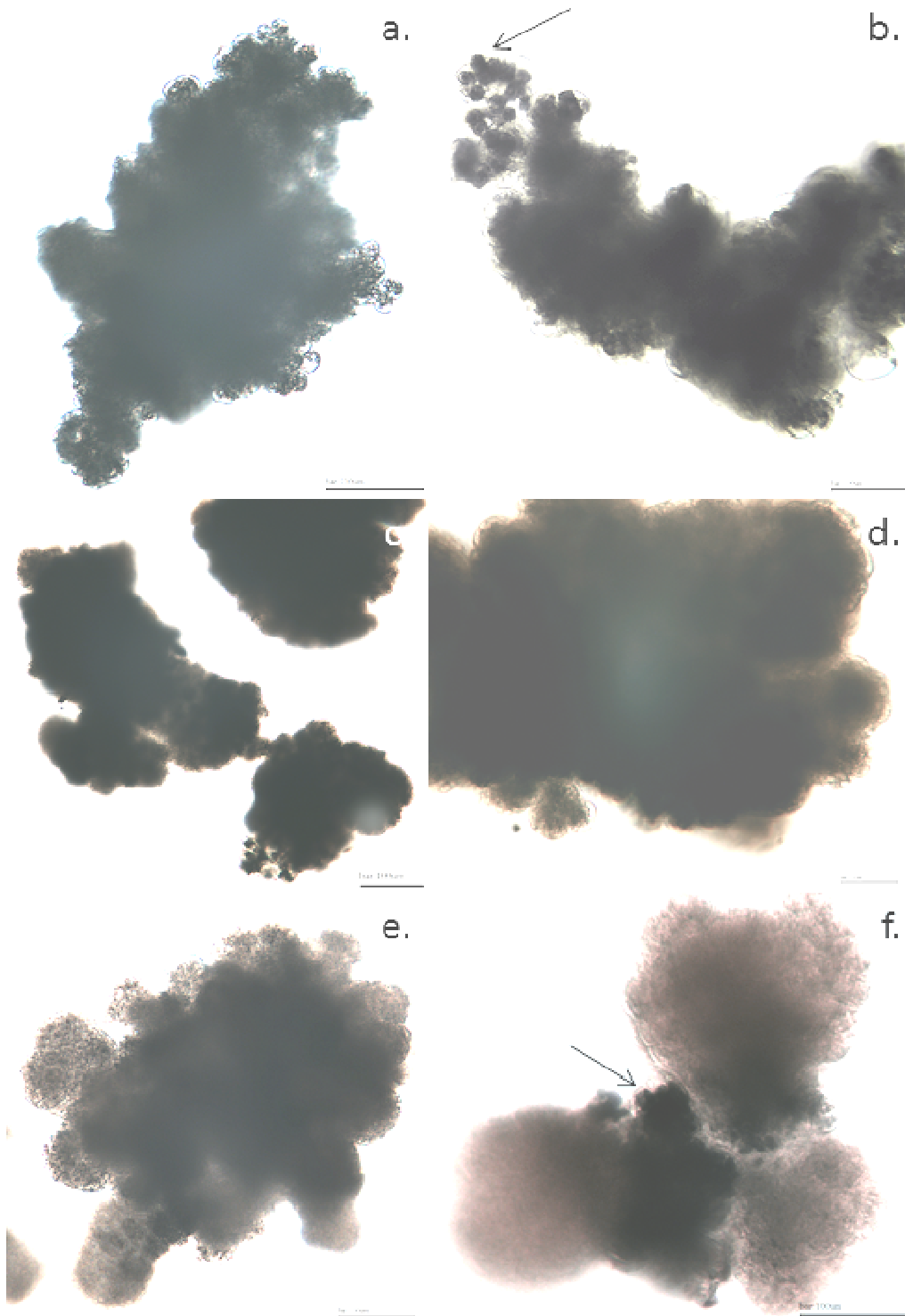
1.ábra: Felső sor: Természetes fertőzéstől származó lokális (baloldalt) és nagy kiterjedésű, összefüggő (középen és jobb oldalon) golyvás tünetek szőlőn. Alsó sor: Mesterséges fertőzéssel indukált tumorok szőlő száron (baloldalt), *Kalanchoe tubiflora*-n (középpüött) és *Kalanchoe daigremontiana*-n (jobbra).



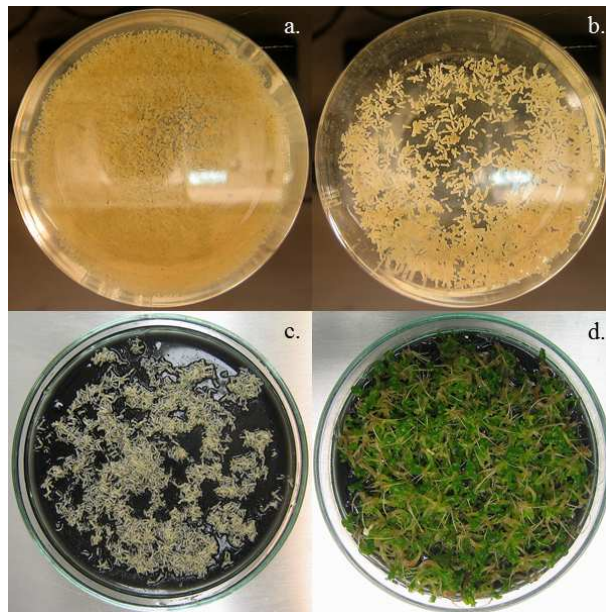
2.ábra: A Vip1a, Vip1b, Vip1c, Vip1d, Vip1e és Vip1f génekre tervezett primerek ellenőrzése szőlő (fajta: 'Richter110') DNS-en PCR-el. A Vip1a gént kódoló genomi DNS tartalmaz egy kb. 6000 bp intront, mely a forward primert inaktíválja, ezért ez itt nem íródott át, de cDNS-en ez a primer is működött.



4.ábra: A Rtnl, Rab8, Vip1 és Hta gén homológok expressziójának változása szőlő levélkorongokon az *Agrobacterium tumefaciens* C58 törzsszel történő fertőzést követően.



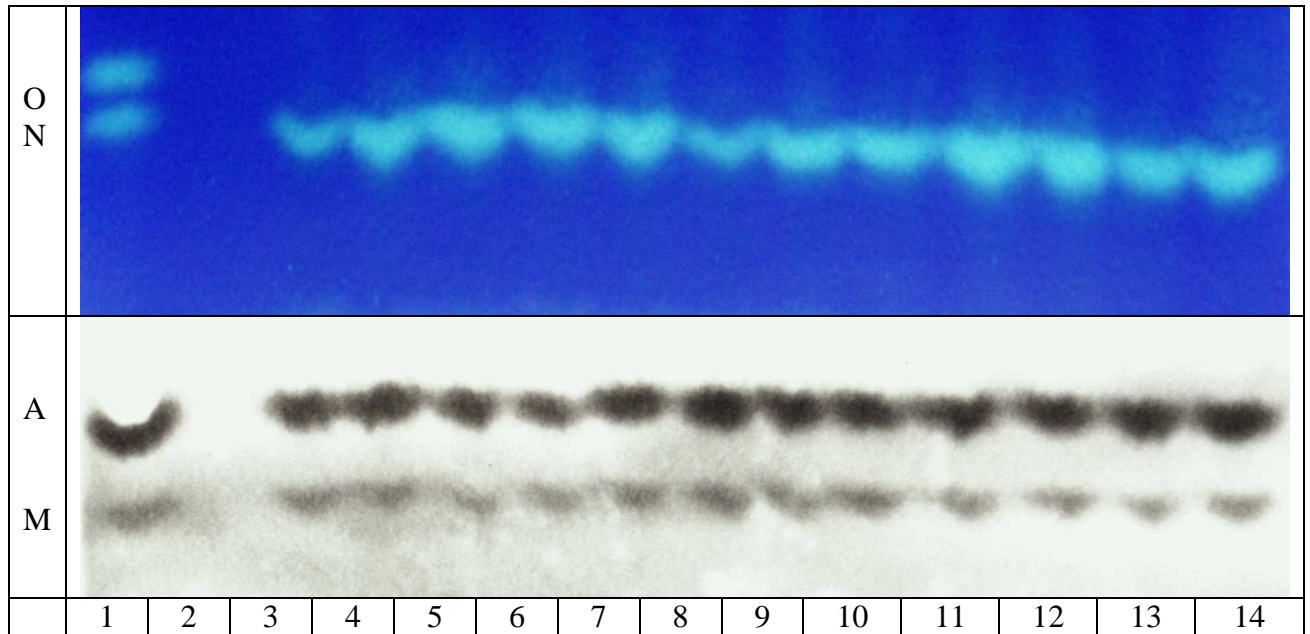
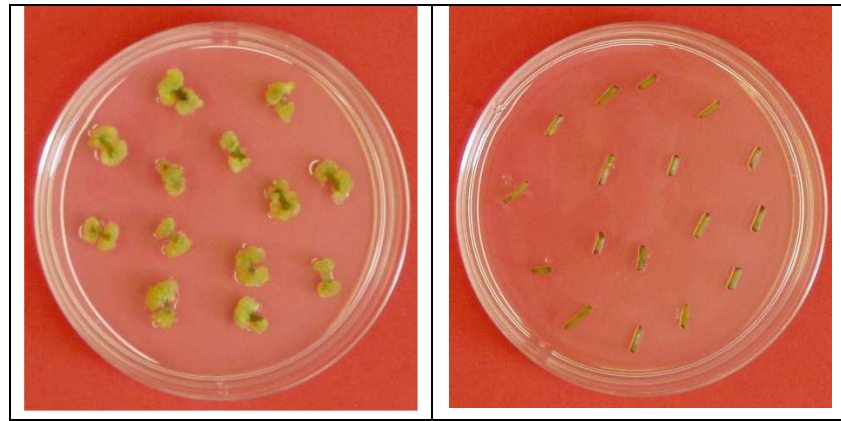
5.ábra: Különböző típusú sejtaggregátumok fénymikroszkópos felvételei. I-es típus (a. és b.), II-es típus (c. és d.), III-as típus (e. és f.). b-f. Lugol-oldattal festve. Nyíl: keményítő szemcséket tartalmazó sejtek.



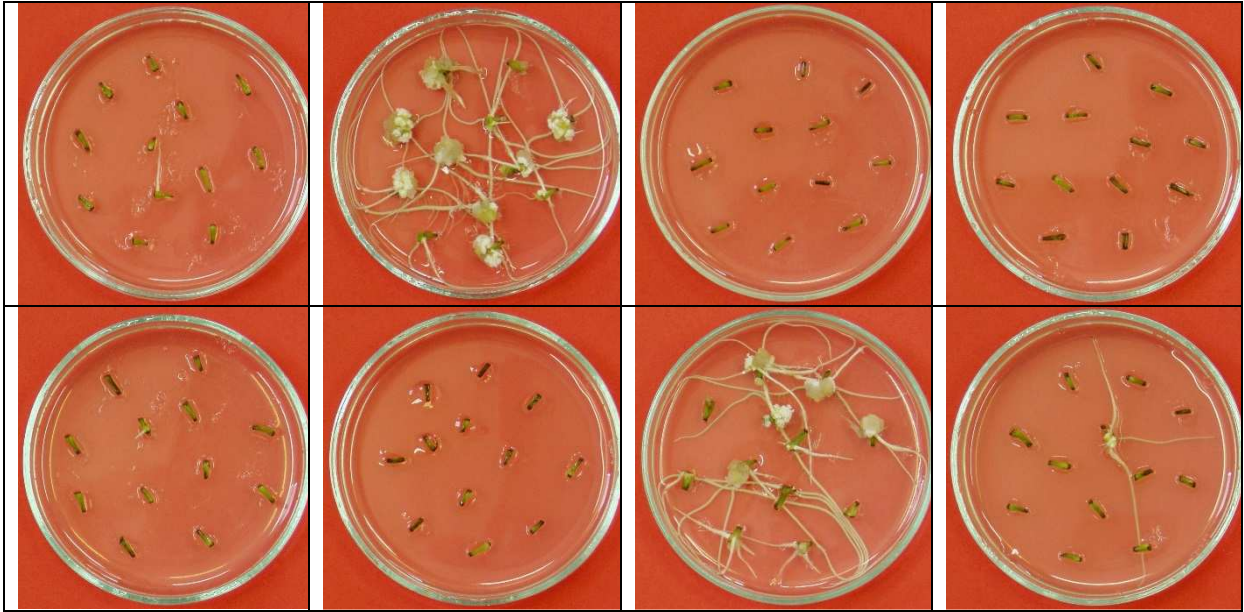
6.ábra: Növényregeneráció szomatikus embriókból (a: embriogén tenyészet folyadékkultúrában, b: embriogenezis folyékony táptalajban, c: embriók fejlődése szilárd táptalajon, d: hajtásregeneráció szilárd táptalajon).



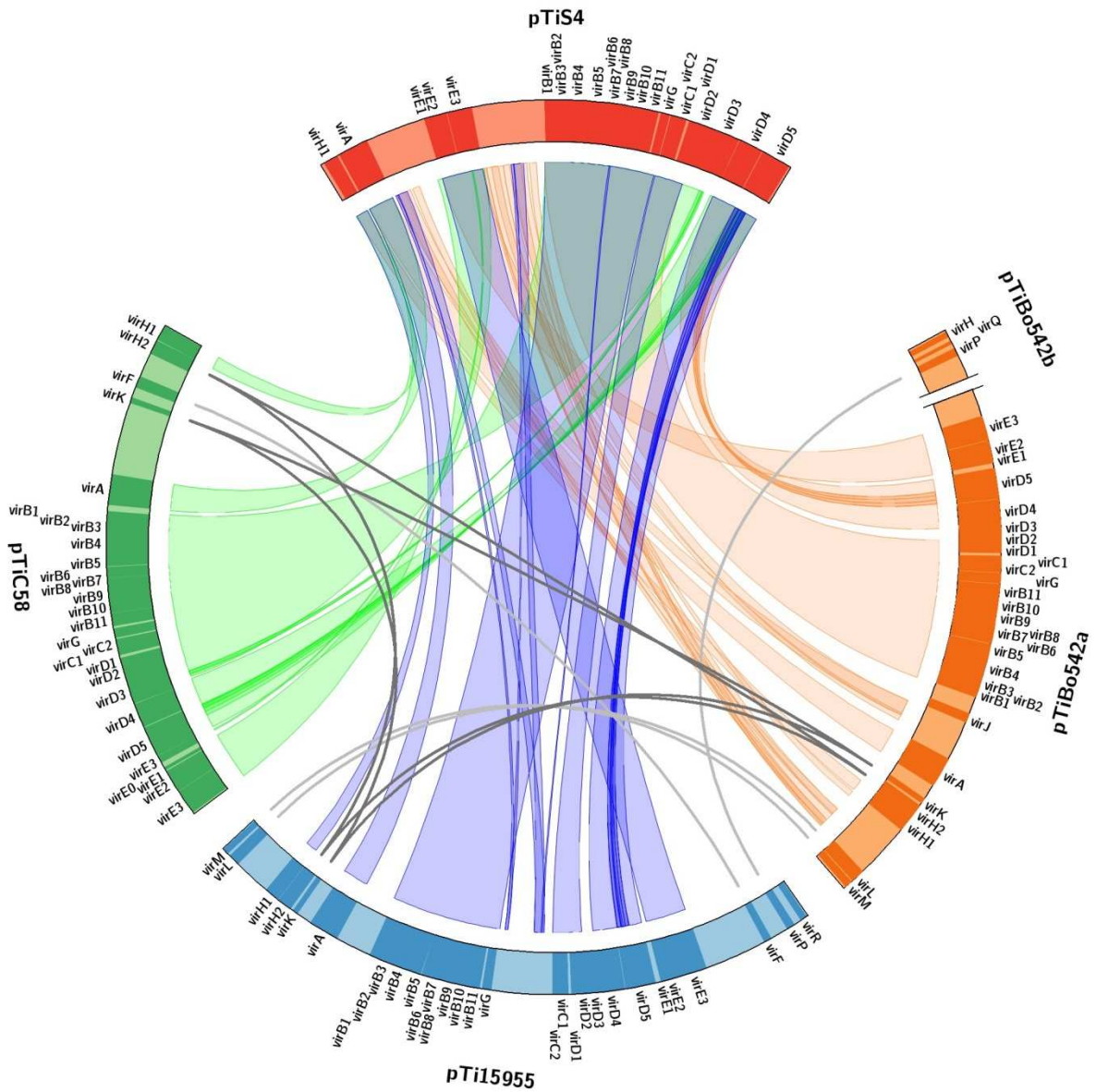
7.ábra: Felül: A steril *in vitro* tenyészetek folyamatos kísérleti lehetőséget biztosítanak, standard körülmények között. Alul: Az agrobaktériumos fertőzésre fogékony (baloldalt: 189/15, K2) és rezisztens (jobb oldalt: 189/18, Kb27) 'Kunbarát' hibridek fertőzése *in vitro*. A fertőzési helyeket (tumorokat) nyilakkal jelöltük.



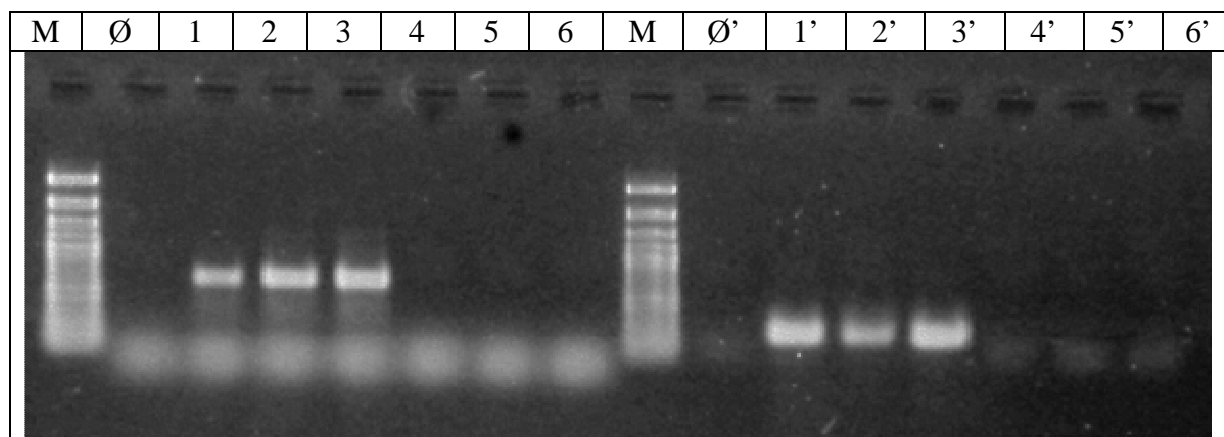
8.ábra: Felül: *In vitro* tumorindukció 'Richter 110' szárszegmenteken hormonmentes táptalajon. Bal oldali kép: *A. tumefaciens* A281-el kokultivált szárszegmentek. Jobboldali kép: Agrobaktériummal nem inokulált kontroll. Alul: *Agrobacterium tumefaciens* törzsek által indukált opinok kimutatása 'Richter 110' *in vitro* szárszegment tumorokból. Felső kép: nopalins kimutatása 12 független, C58 által indukált tumormintából. Alsó kép: agropin és mannopin kimutatása 12 független, A281 által indukált tumormintából. 1. minta: tiszta oktopin (O) és nopalins (N), illetve agropin (A) és mannopin (M). 2. minta: nem-transzformált 'Richter 110' szárkivonat, 3.-14. minták: 12 független tumorkivonat.



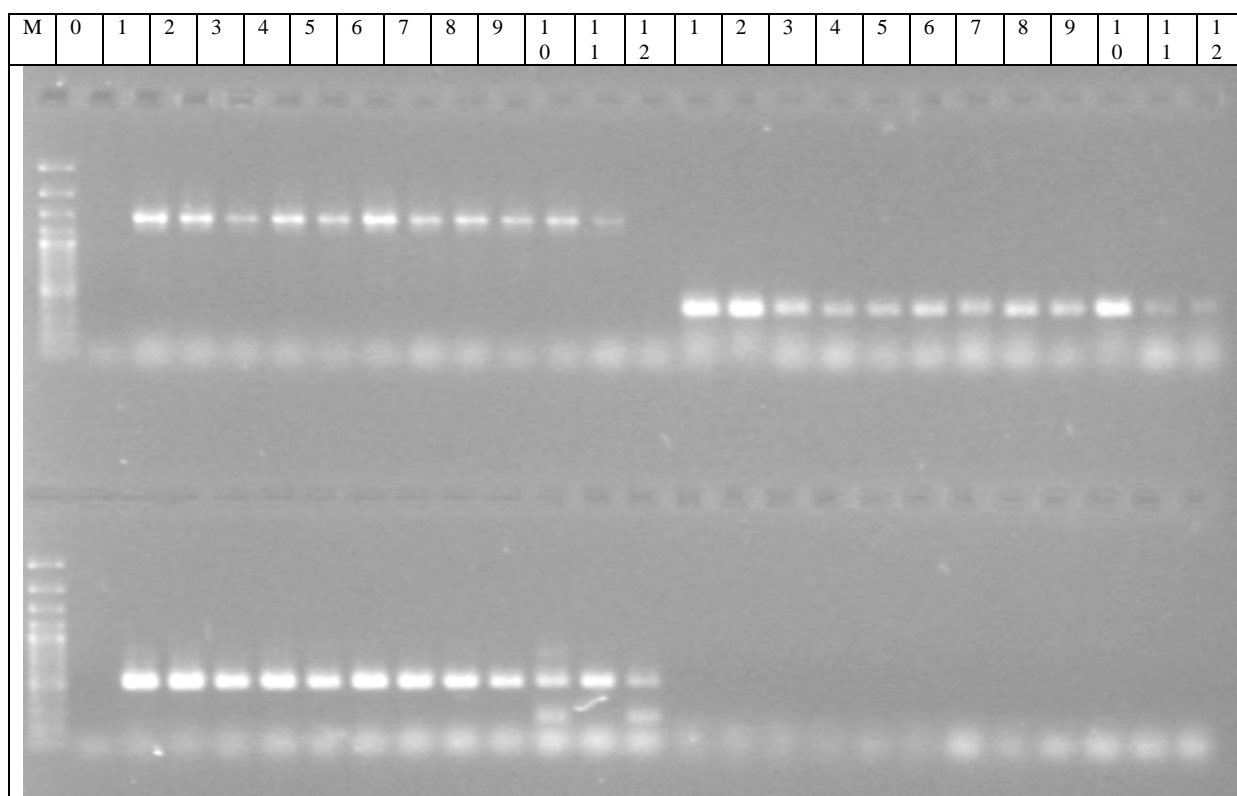
9.ábra: Koinokulációs kísérlet, melynek során *A. tumefaciens* C58 és *A. vitis* S4 törzsszel együtt fertőztük a szőlő (fajta: 'Sauvignon blanc') szárszegmenteket: Az *A. vitis* nem csak hogy nem okoz tumort szárszegmenten, de gátolja az *A. tumefaciens* általi tumorképződést is. Felső sor balról jobbra: Nem inokulált kontroll, C58 (tumor és gyökér), S4, S4aviR- (az S4 nekrosis-mínusz mutánsa). Alsó sor balról-jobbra: UBAPF2 (plazmidtörölt C58), C58+S4, C58+UBAPF2 (tumor és gyökér) és C58+S4aviR-.



10.ábra: A rendelkezésre álló teljes pTi plazmidok Vir régiójának összehasonlítása. A három *A. tumefaciens* törzs (C58: zöld, 15955: kék, Bo542a: barna) Vir régiójának szekvenciáját hasonlítottuk egy *A. vitis* törzs (S4: piros) Vir régiójához. A blastz algoritmussal számított homológ szekvencia szakaszokat jelölik a színes összekötő szalagok. Sötétszürke vonal köti össze a három *A. tumefaciens* törzsben megtalálható, de az *A. vitis* törzsből hiányzó *virK* és *VirH2* géneket.

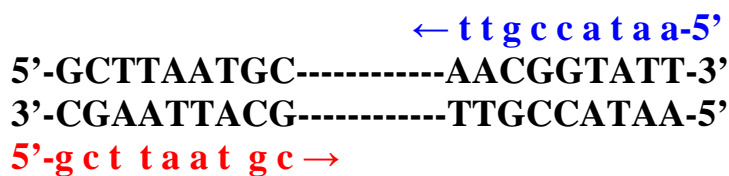


11. ábra: Fig. 4: *Agrobacterium tumefaciens* és *A. vitis* törzsek PCR analízise a *virH2* (1-6) és *virK* (1'-6') gének jelenlétének kimutatására. **M:** méret marker (Fermentas SM0328), **Ø** és **Ø'**: DNS-mentes minták *virH2*-, és *virK*-specifikus primerekkel. **1** és **1'**: *A. tumefaciens* A348, **2** és **2'**: *A. tumefaciens* C58, **3** és **3'**: *A. tumefaciens* A281, **4** és **4'**: *A. vitis* Tm4, **5** és **5'**: *A. vitis* AT1, **6** és **6'**: *A. vitis* S4.

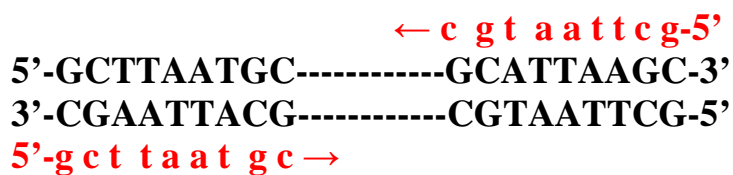


12. ábra: Szőlőfajták PCR analízise az agrobaktérium által indukált génekre. **M:** méretmarker, **0:** DNS nélküli kontroll. Bal felső panel: Rab8a, jobb felső panel: Hta2, bal alsó panel: Hta10, jobb alsó panel: Vip1a. Fajták: 1: 'Chardonnay', 2: 'Fanny' (=R78), 3: 'Kövidinka', 4: 'Arany Sárfehér', 5: 'Kunleány', 6: 'Ezerjő', 7: 'Sauvignon blanc', 8: 'Kadarka', 9: 'Richter-110', 10: 'Gloire de Montpellier', 11: 'TK5BB' és 12: 'FS4'.

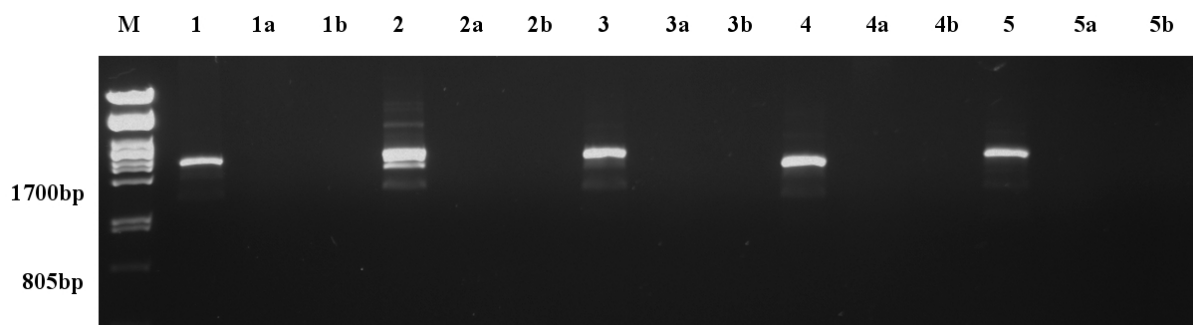
Kétpimeres PCR (Fw≠Rev)



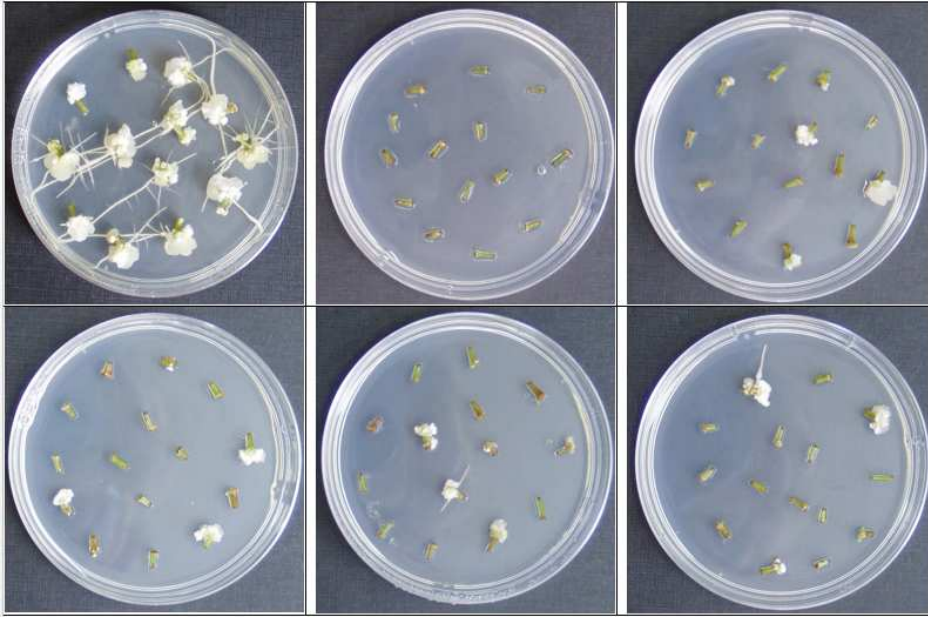
PCR fordított ismétlődő szakaszoknál (Fw=Rev)



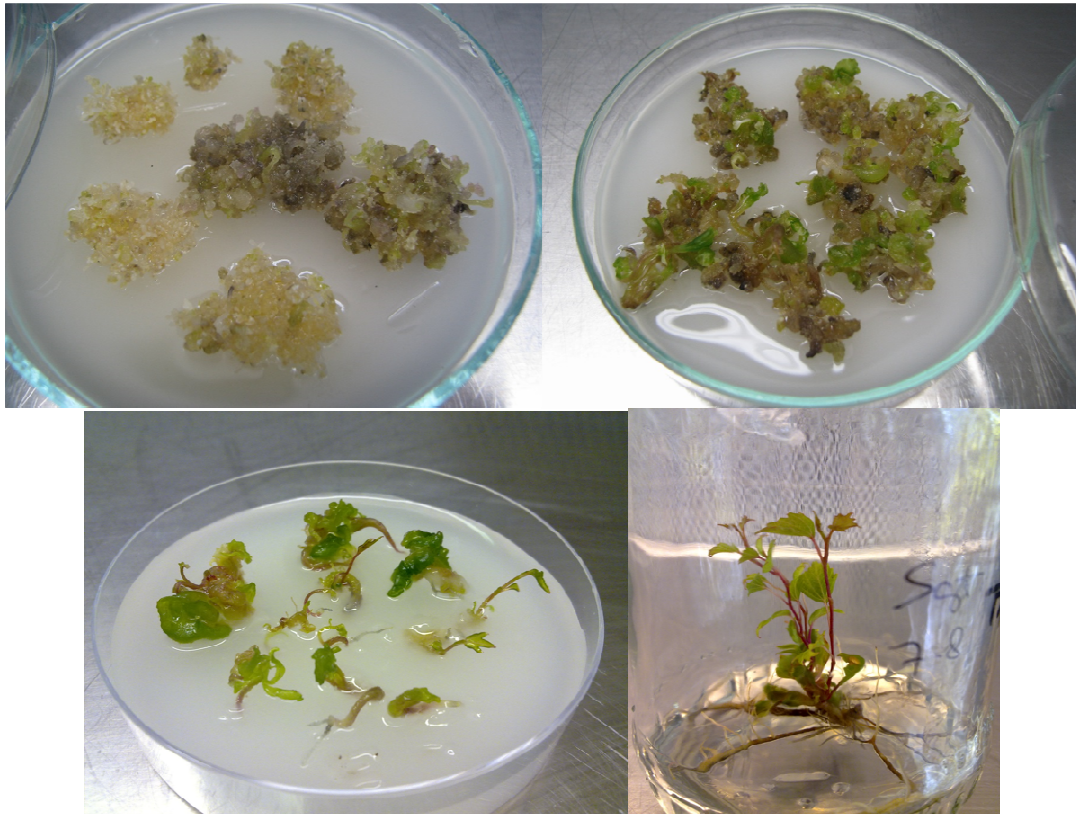
13.ábra: Fordított ismétlődő szakaszok (csendesítő génkonstrukciók) kimutatására elvileg a forward primer (piros) önmagában elég, mivel ez a másik szálon reverz primerként működik (alul), hasonlóan a kétpimeres PCR-hez (felül).



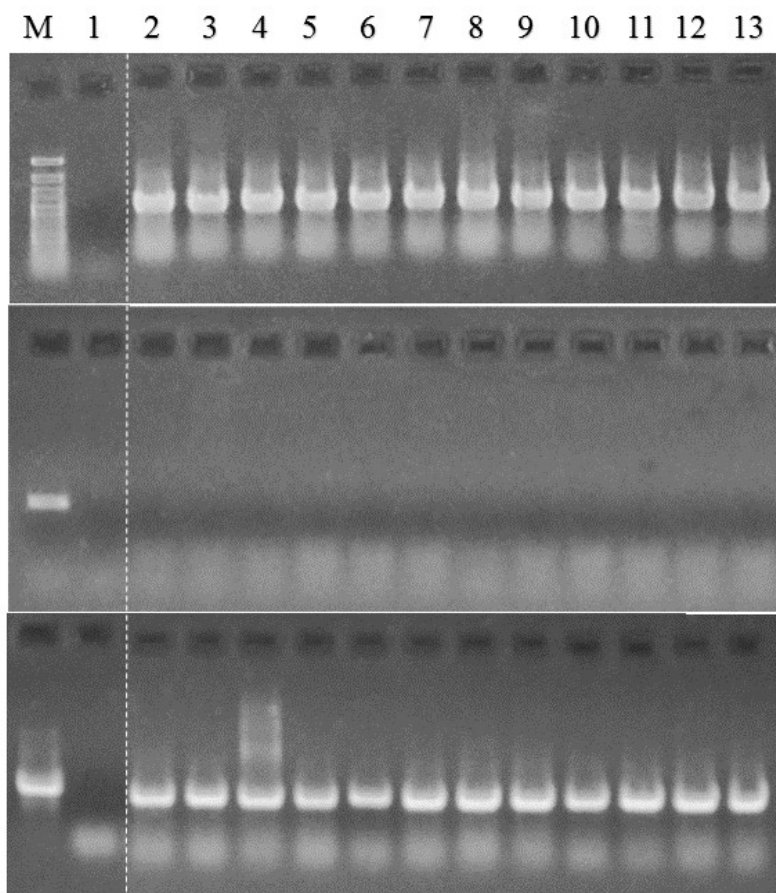
14.ábra: Fordított ismétlődő szakaszok kimutatása PCR-el, egyszerű „forward” primer felhasználásával. M: méret marker (*Pst*I/λ-DNS), 1-1b: VvHta2, 2-2b: VvHta10, 3-3b: VvVip1a, 4-4b: VvRab8a és 5-5b: VvRTNL2. 1, 2, 3, 4, és 5: PCR reakció a fordított, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó konstrukciókkal, „a” minták: pRNAiGG DNS (üres vektor), és „b” minták: DNS mentes kontrol (mindegyik primerrel, külön-külön).



15.ábra: Kettős fertőzések szőlő szárszegmenteken a csendesítő konstrukciók hatásának vizsgálatára. Felső sor balról jobbra (kontroll): *A. tumefaciens* C58, nem inokulált, és az üres RNAiGG-vel inokulált. Alsó sor, balról jobbra: az első inokulációt a következő szőlő génekre tervezett csendesítő konstrukciókkal végeztük: Hta2, Sgt1 és Skp1.



16.ábra: Transzformált növények regenerációja szőlő embriogén tenyészetekből.



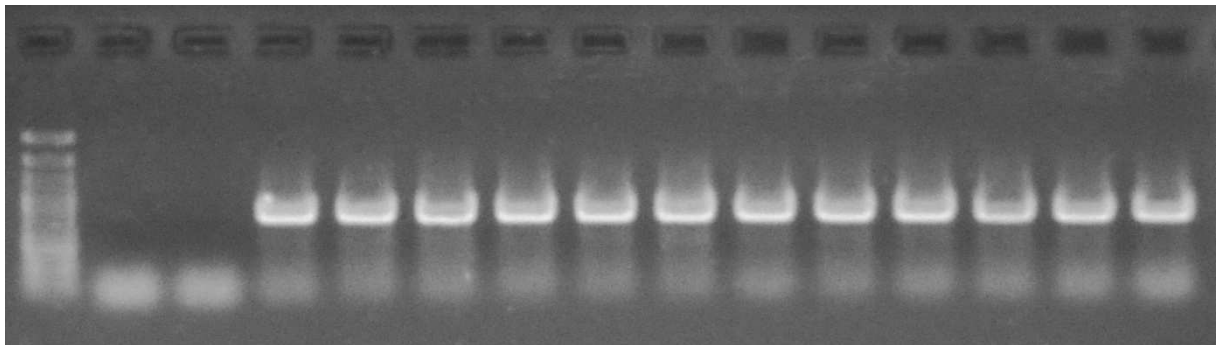
17. ábra: A kanamycinen szelektált 'Richter 110' szőlő vonalak PCR analízise. 1. (felső) panel: PCR *V. vinifera* 18SrRNS specifikus primerekkel, a DNS PCR tesztre való alkalmasságának ellenőrzésére, 2. (középső) panel: PCR az *A. tumefaciens virH2* génjére specifikus primerekkel, mely bizonyítja, hogy a vizsgált növények mentesek a transzformációra használt agrobaktériumtól, 3. (alsó) panel: PCR az *nptII* génre specifikus primerekkel, mely bizonyítja a szelektált vonalak valódi transzformált jellegét. A tesztekhez KAPA *Taq* polimerázt (ZENON, Szeged) használtunk a gyártó szerint javasolt reakcióeleggyel és programmal. A kötődési hőmérséklet 50 (18SrRNS, *virH2*), vagy 54°C (*nptII*) volt.



18. ábra: Fogékonysági tesztek a pJP17-el transzformált *Vitis berlandieri* x *V. rupestris* cv. 'Richter 110' szőlőkön. (A) Nem transzformált 'Richter 110' kontroll az *Agrobacterium tumefaciens* A348 törzsszel fertőzve, (B) nem-fertőzött 'Richter 110', (C) A348-rezisztens vonal, (D) Ugyanaz a rezisztens vonal az *A. vitis* S4-el fertőzve.



19. ábra: Különböző baktériumtörzsek életképessége 6 hónap után (tárolás: ferde agar, 4°C) az ismert alaptáptalajokon (baloldali csészék), illetve azok ásványi sókkal kiegészített változatain (jobboldali csészék). Felül: *Agrobacterium vitis* AT1 (GY táptalajon), alul *Escherichia coli* DH5α (LB táptalajon). A kioltást három különböző tenyészetből végeztük.



20. ábra: Chelex-100-al izolált szőlő DNS PCR analízise 18SrRNS génre specifikus primerekkel 4-4 ismétlésben. Mintasorrend balról jobbra: 1. Mólsúlymarker („létra”), 2. DNS nélküli kontroll, 3. Chelex-nélküli kontroll, 4.-7. 20 mg levélminta/300 µl Chelex, 8.-11. 10 mg levélminta/300 µl Chelex és 12.-15. 5 mg levélminta/300 µl Chelex.

Táblázatok

1.táblázat: A munkánk során felhasznált szőlő szekvenciák és az azonosításukra, izolálásukra, illetve az sqPCR-hez használt primerek. Az *Arabidopsis thaliana* referencia fehérjék (gének) és szerepük az *Agrobacterium*-fertőzésben a szőlő homológokal együtt vannak felsorolva.

<i>A. thaliana</i> fehérje ^a	Szerepe a transzformációban	Szőlő CDS ^b	Szőlő gén	5'-3' primer szekvencia ^c	PCR termék (bp)
AtCSLA-09 (NP195996)	kötődés a növényi sejtfalhoz	01034719001	<i>VvCsla02a</i>	CGTCCGTGCTAGTCTCAAGG CTGGGATCAAAATGGTGAGG	290
		01033767001	<i>VvCsla02b</i>	CATCGAGCGGGTTTATATGG ACTCCAACCTCGACCATCACC	278
		01031405001	<i>VvCsla09a</i>	CCCTGCACCGAACTAAGG AACAAAGGTGCCAACATAACC	299
		01025737001	<i>VvCsla09b</i>	GGTTCCTGATGTTGAGGTTCC TTTCTTGGGTGCCTTAGTGG	256
AtRAB8 (AAB65088)	T-DNS átvitel a növénybe	01016596001	<i>VvRab8a</i>	TGGCAAACGGATCAAATTAC AGAGCTTGACCCTTGGAGGT	261
		01025028001	<i>VvRab8b</i>	TCAGATGGGTCCCTCACCAC CAGCCTTGTTCCCTACCAGT	286
		01025619001	<i>VvRab8c</i>	GTGGGGCCATGGGTATTT TCAGTTTCTGCAAGCCTCTG	298
AtRTNLB 1/2/ (NP194094, NP192861, NP198975)	T-DNS átvitel a növénybe	01019440001	<i>VvRtm1</i>	ATTCCGACAACGAGAAATCG TATTGCCAGTGCGAGTATGG	245
		01027008001	<i>VvRtm2</i>	CCGCATCTGAATCCTTGC AAACAAGGGTGAGGAGATGG	291
AtVIP1 (NP564486)	T-DNS átvitel a növ. sejtmagba, integráció	01034897001	<i>VvVip1a</i>	CGTCGTTTGAGGTTGAATCG GCAACCGTAGTTTGAGTTCC	291
		01032683001	<i>VvVip1b</i>	TGCATACAATTTGGGAATGC GCTTTCCTGCGCAGAAATGG	184
		01024562001	<i>VvVip1c</i>	GTCATTTGACCTGGGAATGC AAAACGTGCTGCTACTCTCG	293
		01024160001	<i>VvVip1d</i>	TTGTTGACGATTTGCTCTCG AATTTTGGCGACTCATCACC	289
		01009846001	<i>VvVip1e</i>	CGCATTAGTAGACCCCAAGC TGGACTTCCAGGGTTAATGC	279
		01010836001	<i>VvVip1f</i>	ACTGGCGCACAAATTTATCC TGGTGTCTGATGCATTTTCC	262
AtH2A (NP200275)	T-DNS beépülés a növényi genomba	01014580001	<i>VvHta2</i>	GCCAAGAAGGCTACATCTCG TTGCGATCGTCACATCTCC	280
		01002735001	<i>VvHta10</i>	TGGAAGAGGAAAATCGTTGG CACCGCCAGTTGAATATGG	262
Actin*				CTTGCATCCCTCAGCACCTT TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	82

^a RefSeq azonosító számok, ^b CDS azonosítók a 12X 'Pinot noir' genomban, ^c Felső: Forward primer, alsó: Reverse primer

*Reid et al. 2006.

2. táblázat: A csendesítő konstrukciók létrehozásához használt primerek

Primer név (specifitás)		Primer szekvencia (5'→3')	A klónozott szakasz mérete (bp)	A forward primer által felszaporított szakasz mérete (bp)
VvHta2	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> ACGGGATCTC AGTGGCTTCT	165	1,995
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> TTCCACAATTG GTCTGTTAGGA		
VvHta10	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> CGATTCTCATG AAGTACAAAACG	268	2,201
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> GGAACCAAA CATCCCAGTC		
VvVip1a	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> CTAATTGGCA GGAAGGCAGA	214	2,093
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> TCCATCCATTA AATGCTCCA		
VvRab8a	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> CCAGGGGAAG GTTCTTCAAG	124	1,913
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> TGCCAAAGCCA GTAGTTGAA		
VvRTNL2	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> TTCCAAGTGGT AGGGCAATC	289	2,243
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> CTGGGCAGAAG GAACAATGC		
VvSKP1	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> GGAGGATGTC CAGAGTGAGAA	245	2155
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> AGTAGGAAACC ATCCAAGCA		
VvSGT1	Forward	<u>ACCAGGTCTCAGGAG</u> GCGATTTTGCT CTTCTGCTC	202	2069
	Reverse	<u>ACCAGGTCTCATCGT</u> TTGGCTCTTGA ATAACAAAAGGA		

3. táblázat: A transzformált növények teszteléséhez és egyéb kísérletekhez (Chelex) használt primerek

Cél gén	primer név	5'-3' szekvencia	Áírt szakasz mérete (bp)	Irodalom
18SrRNS	18S rRNAF	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844	Gambino, Gribaudo 2006
	18S rRNAR	TTCAGCCTTGCGACCATACT		
<i>virC</i>	VCF	ATCATTTGTAGCGACT	730	Sawada et al. 1995
	VCR	AGCTCAAACCTGCTTC		
<i>virD2</i>	virD2A	ATGCCCGATCGAGCTCAAGT	338	Haas et al. 1995
	virD2E	CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCA		
<i>virH2</i>	virH2F	GATCCCTATCCGATTTATCGC	701	Szegedi et al. 2014
	virH2R	GGATTGCAGCAATCCA		
<i>npjII</i>	npjIIF	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA	700	Hoffmann et al. 1997
	npjIIR	AGGCGAGGCGGCTATGACTG		
poligalakturonáz	PGF	GGGGCAGGATGCGTTTTTGAG	466	Szegedi, Bottka 2002
	PGR	GACGGCACTGGGGCTAAGGAT		