



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**  
**Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar**  
**Mezőgazdasági Biotechnológus Msc**

**Búza törpülés vírus rezisztencia kialakítása árpában mesterséges  
miRNS és CRISPR/cas9 technológiákkal**

**Belső konzulens:** Dr. Kis András  
tudományos munkatárs

**Készítette:** Sorbán-Kiss Barbara  
VSV512  
Mezőgazdasági Biotechnológus Msc  
(levelező)

**Intézet/Tanszék:** Genetika és Biotechnológia Intézet  
Növénybiotechnológiai Tanszék

**Gödöllő**

**2023**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Rövidítések jegyzéke.....                                                         | 3  |
| 1. Bevezetés és célkitűzések.....                                                 | 5  |
| 2. Irodalmi áttekintés.....                                                       | 7  |
| 2.1 Az árpa.....                                                                  | 7  |
| 2.1.1 Az árpa eredete és jelentősége .....                                        | 7  |
| 2.1.2 Az árpa genetikája.....                                                     | 8  |
| 2.1.3 Az árpa vírusos megbetegedései .....                                        | 9  |
| 2.2 Árpa transzformációja.....                                                    | 13 |
| 2.3 Agrobaktérium közvetített WDV átvitel.....                                    | 16 |
| 2.4 A növényi RNS interferencia.....                                              | 17 |
| 2.4.1 A kis interferáló RNS-ek és mikroRNS-ek működése.....                       | 19 |
| 2.4.2 Mesterséges miRNS (amiRNS) technológia .....                                | 22 |
| 2.5 A CRISPR/Cas9 technológia .....                                               | 26 |
| 3. Anyag és módszer .....                                                         | 30 |
| 3.1 Növényi anyag és vírusvektorok nevelése.....                                  | 30 |
| 3.3 Molekuláris munkák .....                                                      | 31 |
| 3.3.1 Vektor konstrukciók.....                                                    | 31 |
| 3.3.2 DNS kivonás és PCR .....                                                    | 33 |
| 3.3.3 DNS elektroforézis és DNS visszaizolálás gélből.....                        | 34 |
| 3.3.4 RNS izolálás és cDNS előállítás .....                                       | 34 |
| 3.3.5 Kis RNS northern hibridizáció .....                                         | 34 |
| 3.4 Agrobaktérium közvetített WDV fertőzés .....                                  | 35 |
| 3.5 Kabóca vektorral közvetített WDV fertőzés.....                                | 36 |
| 4. Eredmények és értékelésük.....                                                 | 37 |
| 4.1 WDV fertőzött növények létrehozása agroinokulációval.....                     | 37 |
| 4.2 Kotranszformáns T <sub>1</sub> árpa növény klónok molekuláris vizsgálata..... | 38 |
| 4.3 Kotranszformáns vonalak WDV fertőzésének eredménye.....                       | 39 |
| 5. Következtetések és javaslatok.....                                             | 44 |
| 6. Összefoglalás.....                                                             | 46 |
| 7. Köszönetnyilvánítás .....                                                      | 48 |
| 8. Irodalomjegyzék.....                                                           | 49 |
| 9. Mellékletek.....                                                               | 53 |
| 10. Nyilatkozatok .....                                                           | 57 |

## Rövidítések jegyzéke

|           |                                                                                                                                        |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2,4-D     | 2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav                                                                                                             |
| AGO       | argonauta fehérje                                                                                                                      |
| amiRNS    | artificial micro RNA (mesterséges mikro RNS)                                                                                           |
| BaYMV     | Barley yellow mosaic virus (árpa sárga mozaik vírus)                                                                                   |
| bp        | bázispár                                                                                                                               |
| BYDV      | Barley yellow dwarf virus (árpa sárga törpülés vírus)                                                                                  |
| Cas       | CRISPR- associated (CRISPR-kapcsolt)                                                                                                   |
| cDNS      | kópia DNS                                                                                                                              |
| CP        | coat protein (köpenyfehérje)                                                                                                           |
| CRISPR    | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats<br>(halmozottan előforduló, szabályosan ismétlődő palindromikus szekvenciák) |
| crRNS     | CRISPR RNS                                                                                                                             |
| CYDV      | Cereal yellow dwarf virus (gabona sárga törpülés vírus)                                                                                |
| DCL       | Dicer-like (RNáz típusú endonukleáz)                                                                                                   |
| dsDNS     | double stranded DNA (duplaszálú DNS)                                                                                                   |
| dsRNS     | double stranded RNA (duplaszálú RNS)                                                                                                   |
| hpRNS     | hairpin RNA (hajtű RNS)                                                                                                                |
| IR        | inverted repeat (fordítva ismétlődő szekvencia motívum)                                                                                |
| LB        | left border (baloldali határszekvencia)                                                                                                |
| LIR       | long intergenic region (hosszú intergénikus régió)                                                                                     |
| miRNS     | mikro RNS                                                                                                                              |
| miRNS*    | a miRNS komplementer szála                                                                                                             |
| MP        | movement protein (mozgási fehérje)                                                                                                     |
| mRNS      | messenger RNS                                                                                                                          |
| nt        | nukleotid                                                                                                                              |
| pre-miRNS | prekurzor miRNS                                                                                                                        |
| pri-miRNS | primer miRNS                                                                                                                           |
| PTGS      | Post-Transcriptional Gene Silencing (poszt-transzkripcionális géncsendesítés)                                                          |

|            |                                                                      |
|------------|----------------------------------------------------------------------|
| RB         | right border (jobboldali határszekvencia)                            |
| RCR        | rolling circle replication (gördülő körös replikáció)                |
| RDR        | recombination dependent replication (rekombináció-függő replikáció)  |
| RISC       | RNA-induced silencing complex (RNS-indukált géncsendesítési komplex) |
| SIR        | small intergenic region (rövid intergénikus régió)                   |
| siRNS      | small interfering RNA (kis interferáló RNS)                          |
| sRNS       | small RNA (kis RNS)                                                  |
| ssDNS      | single stranded DNA (egyszálú DNS)                                   |
| TGS        | Transcriptional Gene Silencing (transzkripcionális géncsendesítés)   |
| Ti-plazmid | Tumor indukáló plazmid                                               |
| WDV        | Wheat dwarf virus (búza törpülés vírus)                              |
| WSMV       | Wheat streak mosaic virus (búza csíkos mozaik vírus)                 |

## 1. Bevezetés és célkitűzések

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) fontos szerepet játszik a világ élelmiszerellátásában, valamint a sörgyártásban és az állatti takarmányozásban. Vírusokkal szembeni ellenállóságának javítása fontos cél a mezőgazdasági termelésben. Az árpa vírusrezisztenciájának javítása viszont nemcsak a termelők számára jelent előnyöket, hanem hozzájárulhat az élelmiszerbiztonság és a környezetvédelem előmozdításához is. Az árpa vírusokkal szembeni ellenálló képessége segíthet csökkenteni a vegyszerek használatát a növényvédelemben, így csökkentve a környezeti terhelést és javítva a talajminőséget (Ordon et al. 2009).

Az elmúlt években Magyarországon egyre gyakoribbá váltak a vírusos megbetegedések a gabonafélék körében. A Martonvásári Intézetben termesztett gabonanövények nagyon változatos genetikai háttérrel rendelkeznek. Az itt megtalálható búza a 70-es évektől kezdődően nagy károkat szenvedett vírusos fertőzések miatt. A 80-as és 90-es években a téli árpa is többször súlyos károkat szenvedett, míg a durum búza nagy része 1996-ban elpusztult. Kilenc olyan vírust azonosítottak Magyarországon, amelyek veszélyt jelentenek a gabonafélékre. Az árpa sárga törpülés vírus (BYDV – Barley yellow dwarf virus) és a búza törpülés vírus (WDV – Wheat dwarf virus) a leggyakoribbak és legszélesebb körben elterjedtek, illetve ezek okozzák a legnagyobb mennyiségi és minőségi károkat (Szunics et al. 2000).

A globális felmelegedés következménye lehet az is, hogy a levéltetvek (például árpa sárga törpülés vírus – BYDV – Barley yellow dwarf virus), a kabócák (például búza törpülés vírus – WDV – Wheat dwarf virus) és az atkák (például búza csíkos mozaik vírus – WSMV – Wheat streak mosaic virus) által terjesztett vírusok elszaporodnak. Ez akár a hűvösebb régiókban is nagy terméskiesést okozhat. Az rezisztencia fejlesztése a leginkább környezetbarát és gazdaságilag hatékony megközelítés a vírusok elleni védekezésben (Ordon et al. 2009).

A modern biotechnológiai módszerek lehetővé teszik a gabonanövények gyorsabb javítását különféle tulajdonságok tekintetében, például a kórokozókkal szembeni rezisztencia, szárazságtűrés és a terméshozam növelése érdekében. Az árpával kapcsolatos kutatásokban a hagyományos módszerek mellett az utóbbi években egyre inkább alkalmaznak biotechnológiai módszereket is, mint például a molekuláris markerekkel támogatott szelekció, a génszerkesztés vagy a transzformáció. Ilyen technikák például a CRISPR/Cas9 technológia és az RNS interferencia technikák. A CRISPR/Cas9 technológia lehetővé teszi az árpa

génjeinek célzott módosítását, amelynek eredményeként a növények képessé válnak ellenállni a vírusfertőzéseknek. Az RNS interferencia a növényi gének kifejeződését szabályozza, és ezzel lehetővé teszi a növények számára, hogy meghatározott fehérjéket állítsanak elő. Az RNS interferencia szintén lehetővé teszi a növény számára, hogy gátolja a vírusok génjeinek működését, ami akadályozza a vírusok terjedését és szaporodását a növényben. (Abdallah et al. 2015).

Végző soron, a vírus rezisztens gabonanövények létrehozása nem csak javíthatja a terméshozamot és a minőséget, hanem lehetővé teszi az agráriumban dolgozók számára, hogy gazdaságosabban és fenntarthatóbban termeljenek. Az ilyen típusú növények előállítása azonban hosszú és költséges folyamat. További kutatásokra van szükség a legjobb megoldások megtalálásához (Zhang & Wang 2015).

Célkitűzésem egy olyan transzgénikus árpa tesztelése volt, amely CRISPR/Cas9 technológia és az RNS interferencia (mesterséges miRNS) technológiával szimultán tud védekezni a búza törpülés vírus (WDV – Wheat dwarf virus) ellen. Munkám a MATE Genetika és Biotechnológia Intézetének két korábbi munkájára alapszik. Kis et al. (2015) olyan transzgénikus árpa növények létrehozásáról számol be, amelyek mesterséges miRNS alapú WDV rezisztenciával rendelkeznek. Kis et al. (2019) pedig CRISPR/Cas9 rendszer használatával tudták hatékonyan befolyásolni a WDV fertőzés mértékét. Terveim között szerepelt elsősorban olyan kotranszformáns árpa növények *in vitro* felszaporítása, amelyek WDV specifikus policisztronikus mesterséges miRNS és CRISPR/Cas9 konstrukciókat tartalmaznak. Ezután célom volt a két vektor konstrukció expressziójának kimutatása. A kotranszformáns növények későbbi rovarvektoros fertőzéséhez szerettem volna WDV fertőzött növényeket agroinokulációval létrehozni. A végső kitűzött cél a felszaporított kotranszformáns növények WDV fertőzése és rezisztenciájuk vizsgálata volt.

## 2. Irodalmi áttekintés

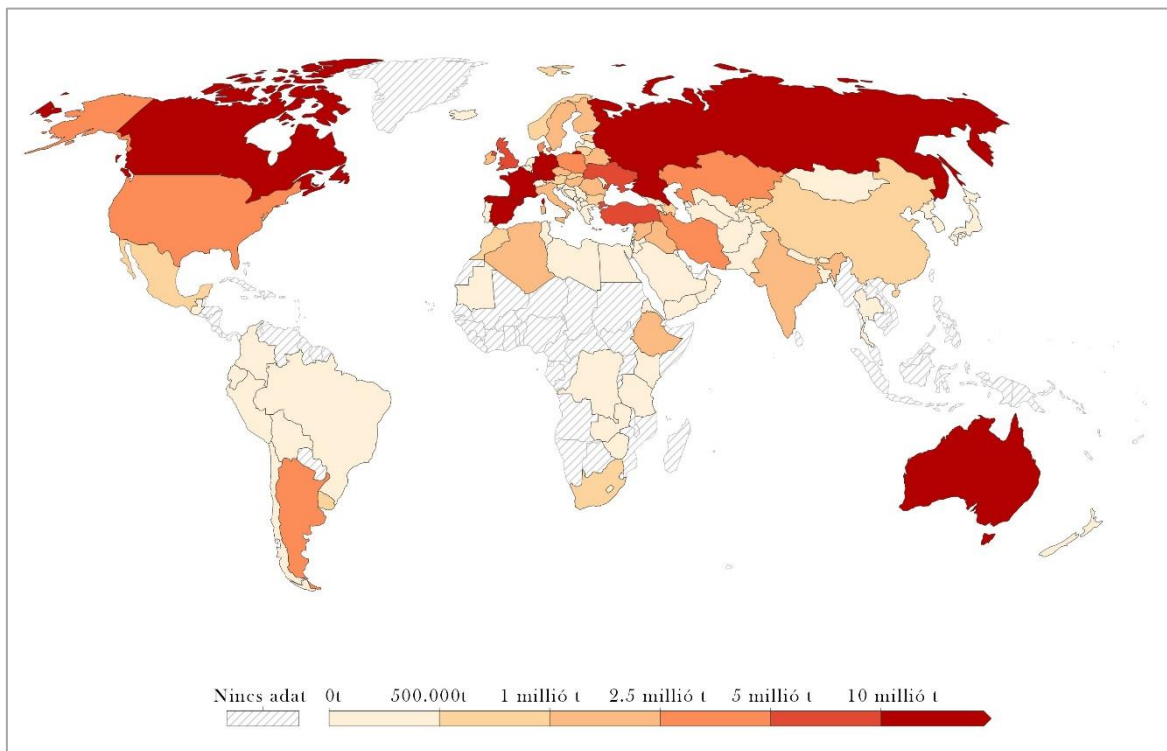
### 2.1 Az árpa

#### 2.1.1 Az árpa eredete és jelentősége

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) a világ negyedik legfontosabb haszonnövénye a gabonafélék (*Gramineae*) családján belül, a kukorica (*Zea mays* L.), a búza (*Triticum aestivum* L.) és a rizs (*Oryza sativa* L.) után (Dahleen et al. 2007). Feltehetőleg először mintegy 10 000 évvel ezelőtt házasították vadon élő rokonából, a *Hordeum spontaneum*-ból. Bizonyítékok vannak arra, hogy az árpát először Izrael-Jordánia területén, az úgynevezett Termékeny félhold övezetben termesztették, hiszen a *H. spontaneum* a mai napig fellelhető ezen a vidéken. A *H. spontaneum* és a *H. vulgare* kinézetre hasonlóak, viszont a termesztett forma szélesebb levelekkel, rövidebb szárral, nagyobb kalásszal és nagyobb szemekkel rendelkezik. Az ősi árpa kalásza eredetileg kétsoros, viszont a modern árpafajták morfológiája eltérő lehet, manapság találkozhatunk kétsoros és hatsoros típusokkal egyaránt (Harwood 2019). A *H. vulgare* a *Poaceae* család *Triticeae* törzsének tagja és több alfaja is ismert. Alfajai közül gazdaságilag legjelentősebb az őszi árpa (*H. vulgare* convar. *hexastichon*) és a tavaszi árpa (*H. vulgare* convar. *distichon*). A két alfaj morfológiailag és beltartalmát illetően is elkülönül egymástól (Jolánkai 2005). Az árpa egynyári növény, a tavaszi árpát tavasszal vetik, az őszi árpát pedig ősszel, hiszen az őszi árpának szüksége van hideg periódusra virágzás előtt (Harwood 2019).

Az árpa számos egyedi és előnyös tulajdonsággal rendelkezik. Egy sokoldalú növény, amely emberi táplálkozásra és állati takarmányozásra egyaránt alkalmas. Kísérleti modellnövényként lehetővé teszi a növénygenetika, növényfiziológia, növénypatológia, növényi biokémia és egyéb tudományágak fejlődését a növényi biotechnológiában. A fő árpatermelő országok Oroszország, Németország, Franciaország, Ukrajna, Ausztrália és Kanada (1. ábra). Az árpa nagyon jól alkalmazkodó és robusztus növény, amelyet ma már több mint 100 országban termesztnek világszerte. Bár leginkább mérsékelt égövi országok haszonnövénye, egyes trópusi vidékeken is termesztik. Az árpatermelés legalább 60%-át takarmányozásra használják fel, a többit emberi fogyasztásra veszik igénybe, főleg a söriparban (Harwood 2019). Az utóbbi időben megnőtt az érdeklődés az árpa élelmiszeripari felhasználása iránt. Ennek oka az ételmi rost tartalma, különösen a  $\beta$ -glükáné, amelyről kimutatták, hogy csökkenti a vér koleszterinszintjét és a vércukorszintet. Az árpa és az

árpatermékek fő összetevői az említett  $\beta$ -glükánon kívül a keményítő, a cukor, a fehérjék és a zsír (Lukinac et al. 2022).



**1. ábra: A Föld árpatermelése tonnában mérve 2020-ban** (forrás: [www.ourworldindata.org](http://www.ourworldindata.org))

### 2.1.2 Az árpa genetikája

A különféle nemzetközi együttműködések révén az árpa genomját megszekvenálták és egy jelentős adatbázist állítottak össze. Számos vadon termő és termesztett árpát gyűjtöttek be és vizsgáltak világszerte. Rendelkezésre állnak szekvenciák és információk a nukleáris genomról, az organelláris genomokról és a transzkriptomokról is (Sato 2020). Az árpagenom szekvencia sorrendjének azonosítása és feltérképezése 2012-ben fejeződött be, és a genomprojekt eredményeként sikerült feltárni az árpa teljes genomját. A projekt során a kutatók közel 26 millió darab árpagenom-szekvenciái adatot használtak fel a genom feltérképezéséhez, amely során az egyes gének helyét és funkcióját is sikerült megállapítani (Mayer et al. 2012). Az árpa hét kromoszómából álló diploid genommal ( $2n=2x=14$ ) rendelkezik. A genom viszonylag nagy, becült mérete 5,1 Gbp, amelynek több mint 80%-a ismétlődő elemekből áll (Sato 2020). Mayer és munkatársai kutatásai alapján összesen 38.000-48.000 gént kódoló szekvencia található a teljes árpa genomban (Mayer et al. 2009).

Amellett, hogy az árpa önmagában is fontos növény, diploidként kiváló modellnövény lehet a bonyolultabb genomfelépítésű hexaploid búza kutatásokban (Bartlett et al. 2008).

Mint diploid, öntermékenyülő, mérsékelt égövi növény, az árpa mindig is a növénygenetikai kutatások népszerű modellnövénye volt. Mivel az árpa különböző fajtái széles éghajlati körülmények között is megélnek, így kétségtelenül tartalmazznak olyan allélokat, amelyek előnyösek lehetnek az éghajlatváltozás esetén okozta abiotikus stresszhatások leküzdésére (Consortium 2012).

### 2.1.3 Az árpa vírusos megbetegedései

A növények vírusos megbetegedései jelentős mennyiségű termésveszteséget okoznak az egész világon minden évben. Fontos azonban megjegyezni, hogy a vírusos fertőzések nem csak a termés mennyiségére vannak hatással, hanem befolyásolhatják a növények minőségét, ezáltal az élelmiszerbiztonságot és a gazdasági teljesítményt is. A növényvédő szakemberek és a gazdálkodók mindent megtesznek annak érdekében, hogy megelőzzék és kezeljék ezeket a vírusos megbetegedéseket (Roos et al. 2011).

Az árpát fertőző vírusokat két csoportra lehet osztani. Léteznek talajban terjedő vírusok és rovarok által terjesztett vírusok. A talajban terjedő vírusoknál minden esetben a *Polymyxa graminis* juttatja a kórokozókat a gyökérbe. Többek között ide tartozik a *Potyviridae* család *Bymovirus* nemzetségének tagja, az árpa sárga mozaik vírus (Barley yellow mosaic virus – BaYMV) is. A rovarok által terjesztett vírusokat általában levéltetvek és kisebb rovarok juttatják a növény floém részébe. Ide tartozik például a levéltetvek által közvetített árpa sárga törpülés vírus (Barley yellow dwarf virus – BYDV; *Luteovirus*) és gabona sárga törpülés vírus (Cereal yellow dwarf virus – CYDV; *Polerovirus*), illetve a csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus*) által terjesztett búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus – WDV; *Mastrevirus*) (Ordon et al. 2009).

Magyarországon a leggyakoribb és legszélesebb körben elterjedt vírusok az árpa sárga törpülés vírus (Barley yellow dwarf virus – BYDV; *Luteovirus*) és a búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus – WDV; *Mastrevirus*). A búza törpülés vírust 1988-ban azonosították Magyarországon. A vírusra jellemző tünetek nagyon hasonlóak az árpa sárga törpülés víruséhoz, ezért lehetetlen őket kizárólag morfológiai megjelenés alapján megkülönböztetni. A fertőzött gabonanövények levelei aranyszínűek vagy narancssárgák, a levelek mereven kiállnak és csavarodnak. Amennyiben a fertőzés fiatal növényt támad meg, úgy a növény

növekedése visszamaradott lesz (2. ábra). A kifejlődött fertőzött egyedek gyakran sterilek, esetleg apró magokat tartalmaznak (Szunics et al. 2000).



**2. ábra: Búza törpülés vírussal (WDV) fertőzött árpa növények (a szerző fotója)**

A *Geminiviridae* család az egyik legnagyobb és legfontosabb növényeket fertőző víruscsalád. Nevüket a virionszerkezetükről kapták, amely két egyforma ikozahedrális kapszid burkból áll. A család minden tagja egy egyszálú cirkuláris DNS molekulával rendelkezik, amelynek mérete körülbelül 2.5–3.0 kilobázis. A genom replikációja teljes mértékben a gazdasejttől függ, hiszen az egyszálú DNS molekula (ssDNS) dupla szálú DNS molekulává (dsDNS) alakítására a fertőzés következtében kerül sor. Miután a dupla szálú DNS molekula (dsDNS) létrejött, elkezdődik a replikáció, amelyre több különböző módszer fejlődött ki, ezáltal növelve a genetikai változatosságot és az adaptációs képességet. A geminivírusok genomja sokszorozódhat gördülőkörös replikáción (RCR – rolling circle replication) és rekombináció alapuló replikáción (RDR – recombination dependent replication) keresztül is (Gutierrez et al. 2004). A geminivírusok kisméretű, egyszálú DNS-genomjai 5-7 olyan fehérjét kódolnak, amelyek átprogramozzák a gazdasejtet arra, hogy produktív fertőzést hozzanak létre. Ezek a gének újra programozzák a növényi sejtciklust és a transzkripciót, gátolják a sejthalált, zavarják a sejtek közötti kommunikációt és a fehérje anyagcserét, illetve blokkolják a védekezési mechanizmusokat. A geminivírusokat a vírusok

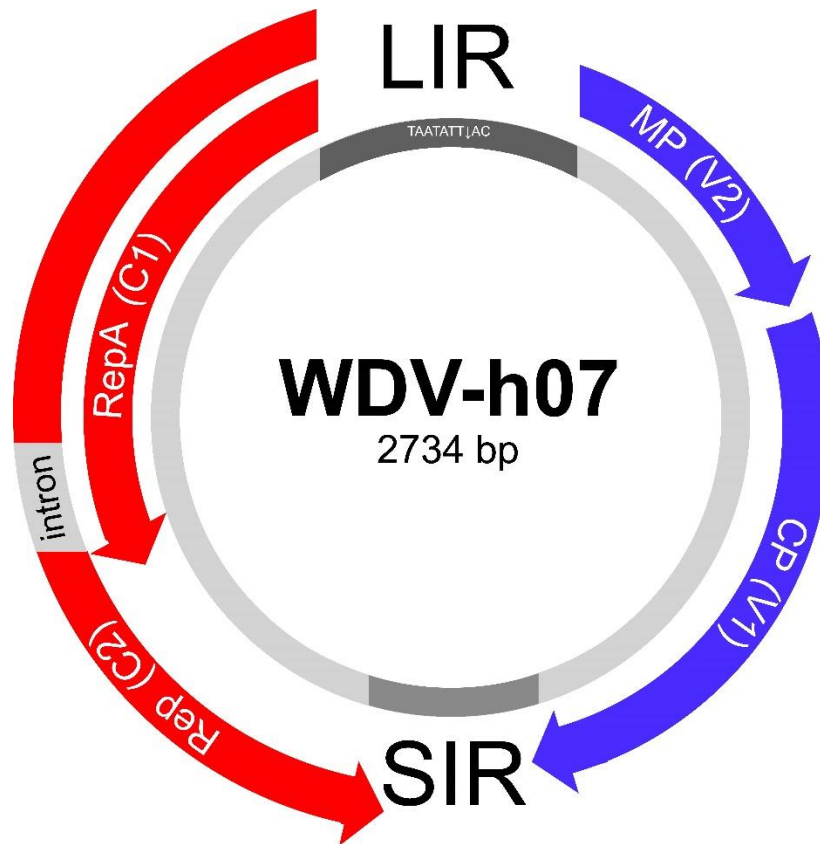
taxonómiájával foglalkozó nemzetközi bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses) hét nemzetségbe sorolja (*Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Topocuvirus* és *Turncurtovirus*) a genom szerveződésük és rovarvektoraik alapján (Hanley-Bowdoin et al. 2013).

A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus – WDV) a *Mastrevirus* nemzetségbe tartozik. A búza törpülés vírusnak két törzsét különböztetik meg: a búza és az árpa törzset (Kvarnheden et al. 2002). Az árpa és a búza törzsek genomjának szekvenciája körülbelül 84%-ban megegyezik (Ramsell et al. 2009). Habár a két változat genetikailag nagyon hasonló, az árpa törzs nem fertőzi meg a búzát és a búza törzs sem fertőzi meg az árpát. Mindkét típust a csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus*) terjeszti (Kvarnheden et al. 2002).

A búza törpülés vírus (Wheat dwarf virus – WDV) egyszálú DNS molekulája méretét tekintve körülbelül 2750 bázispár, két intergénikus régiót és négy fehérjét kódoló gént tartalmaz. A nagy intergénikus régió (LIR) és a kis intergénikus régió (SIR) egymással szemben helyezkednek el a cirkuláris DNS-en (Gutierrez et al. 2004). Az intergénikus régióknak a génexpresszióban és a transzkripcióban van szerepük. A WDV genomon belül a nagy intergénikus régió (LIR) a legvariábilisabb régió, itt történik leggyakrabban nukleotid kicserélődés (Kvarnheden et al. 2002). Ezen belül található a vírus szensz DNS szál replikációs origója is, amely egy konzerválódott szekvencia szakasz (5'- TAATATT↓AC -3') a Geminivírusok családjában, ezen kívül a LIR régió egy kétirányú promóter szekvencia is egyben. A kis intergénikus régió (SIR) szabályozza a transzkripció terminációját (Ramsell et al. 2009). A tipikus *Mastrevirus* genom négy különböző fehérjét kódol: két replikáció-asszociált fehérjét (RepA, C1; Rep, C2), egy mozgási fehérjét (MP – movement protein; V2) és egy köpenyfehérjét (CP – coat protein; V1) (3. ábra). A mozgási fehérje (MP) és a köpenyfehérje (CP) a vírus szensz szálon, a két replikáció-asszociált fehérje pedig a komplementer szensz szálon vannak kódolva (Gutierrez et al. 2004).

A két replikációért felelős fehérje (RepA, C1; Rep, C2) a vírus genomjának replikációjáért felelős. A Rep fehérje végzi a replikációt, a RepA fehérje pedig arra ösztönzi a gazdasejtet, hogy S-fázisban maradjon, így a növényi sejt folyamatosan a DNS replikációra van felkészülve. A mozgási fehérje (MP) felelős a fertőzés sejtről-sejtre terjedéséért. A köpenyfehérje (CP) elsősorban a vírus kapszidját alkotja és megvédi a vírus DNS-t a külső hatásoktól. Ezen felül nukleáris transzfer fehérjeként (NSP) is működik azáltal, hogy

azonosítja és kapcsolódik a célsejtekhez a növényi szövetekben (Hanley-Bowdoin et al. 2013).



**3. ábra: A WDV genom szerkezete:** Rep, RepA– replikáz gének, MP – mozgási fehérje gén; CP – köpenyfehérje gén; SIR – rövid intergénikus régió; LIR - hosszú intergénikus régió (Kis et al. 2019).

A búza törpülés vírus (WDV) az elmúlt évtizedekben leginkább Svédországban okozott jelentős károkat, viszont az éghajlatváltozás negatív hatásai miatt több európai országban is nagy figyelmet keltett. Búzában történt megfigyelések során arra jutottak, hogy a korai vetésű fiatal növények fertőzése során következnek be a legnagyobb károk, szárba indulás után bekövetkező vírusfertőzések nem okoznak jelentős termésveszteséget. A beteg egyedek gyakran foltokban fordulnak elő a szántóföldeken (Lindblad & Sigvald 2004).

## 2.2 Árpa transzformációja

A gabonanövények transzformációja széles körben elterjedt technika az egyes genomikai kutatások során. Az árpa önmagában is fontos növény, viszont ezen felül diploidként kiváló kísérleti modell az összetettebb genomú gabonanövények körében. Az első termékeny transzgénikus árpa növényeket a 90-es években éretlen embriók bioliztikus transzformációjával (génpuska) állították elő, majd később az *Agrobacterium tumefaciens* baktérium által közvetített transzformáció vált népszerűvé. A kiindulási szövet (explantum) éretlen embrión kívül lehet mikrospóra vagy hajtás merisztéma is. Az árpa transzformációhoz mégis az éretlen embrió a legalkalmasabb és legelterjedtebb explantum (Bartlett et al. 2008).

Az éretlen embrió eredetű kalluszból származó növényi regenerációt befolyásolja a genotípus, az embrió kora, a táptalaj összetétele, a tenyésztés módja és egyéb tényezők. A legjobban transzformálható fajta egy kétsoros tavaszi árpa, a 'Golden Promise'. Az embriók kora kritikus a szövettenyésztésnél, hiszen befolyásolja a kialakuló kallusz textúráját, szervezettségét, minőségét és a regenerációs rátáját. Általában a beporzás után 10-13 napot kell várnunk, hogy az embriók megfelelő fejlettségi státuszban legyenek. Ekkor méretük 0.7-1.4 cm (Bo et al. 2015). Az éretlen embriók izolálása apró méretükből kifolyólag mikroszkóp alatt történik. Az embriók szkutellum szöve (sziklevél) a legalkalmasabb embriogén kallusz létrehozására (Bartlett et al. 2008). Ebből kifolyólag mielőtt az éretlen embriókat táptalajra helyezik, az embriogén tengelyt, az axis-t eltávolítják, ezzel meggátolva a hajtás- és gyökércsúcs fejlődését (Bo et al. 2015).

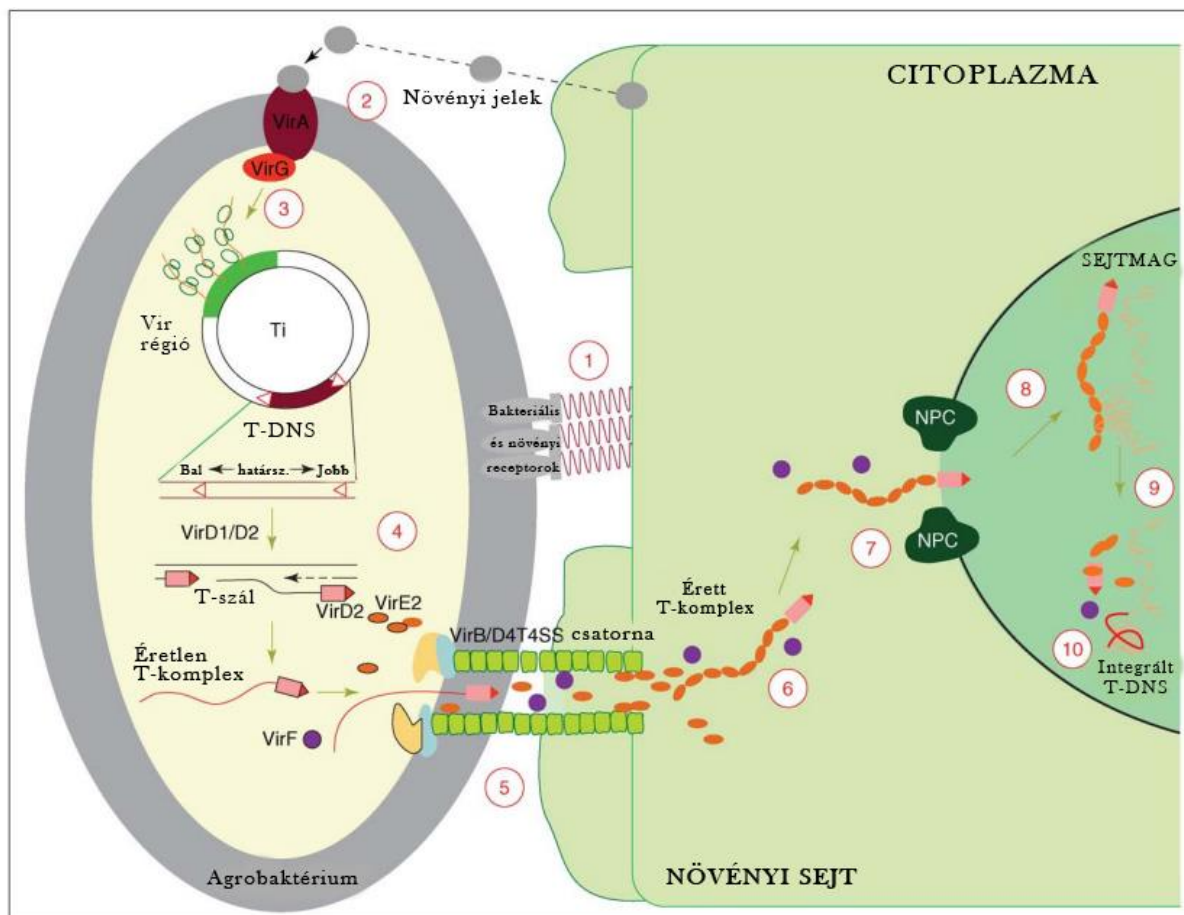
Ahhoz, hogy az éretlen embrió szkutellum szövetéből kalluszt hozzunk létre megfelelő környezetet kell biztosítanunk a sejteknek. A táptalajnak tartalmaznia kell a szükséges szénhidrátot, mikro- és makro elemeket, illetve különböző vitaminokat és hormonokat. Általában elengedhetetlen valamilyen auxin jelenléte is, amely lehet a 2,4-D (2,4-Diklorofenoxi-ecetsav) vagy a Dicamba. Ez fogja indukálni a növényi szomatikus embriogenezist, amely által a kallusz 3-6 hétig fejlődik (Bhojwani & Dantu 2013).

A bioliztikus és az *Agrobacterium tumefaciens* baktérium által közvetített technikák összehasonlítása során kimutatták, hogy az *Agrobacterium* által közvetített transzformáció hatékonyabb és alkalmasabb kisebb számú transzgén kópiával rendelkező transzgénikus vonalak előállításához. Ráadásul az *Agrobacterium* által közvetített technikákkal létrehozott vonalakban a transzgén expressziója generációkon keresztül stabilabbnak bizonyult, illetve kevesebb esetben következett be a transzgén csendesítése is (Bartlett et al. 2008).

Az *Agrobacterium tumefaciens* egy talajban előforduló Gram negatív baktérium, amely képes növényeket fertőzni és génjeit bejuttatni a növényi sejtekbe. Az *Agrobacterium tumefaciens* a saját genomján felül tartalmaz egy extrakromoszómális cirkuláris DNS-t, amit tumorindukáló vagy Ti-plazmidnak is nevezünk. A baktérium genetikailag úgy alakítja át gazdáját, hogy egy jól meghatározott DNS-szakaszt visz át tumorindukáló (Ti) plazmidjából a gazdasejt genomjába. Az átvitt DNS (T-DNS) egy sor onkogént és opine-katabolizmus géneket hordoz, amelyek kifejeződése a növényben opinek és aminosavak termelődéséhez vezet. A traszformált szövetben újonnan termelődött opinek és aminosavak elégítik ki a baktérium nitrogén szükségletét (Tzfira & Citovsky, 2006).

A fertőzés kezdeti lépéseként az agrobaktérium felismeri a gazdasejtet és kapcsolódik hozzá. A specifikus növényi jelek érzékeléséért a VirA/VirG kétkomponensű jelátviteli rendszer felelős. A vir génrégió aktiválását követően VirD1/D2 fehérjekomplex létrehozza a T-DNS mobil kópiáját. Az éretlen T-komplex több más Vir fehérjével együtt bekerül a gazdasejt citoplazmájába. A citoplazmában létrejön az érett T-komplex, amely aktívan importálódik a gazdasejt magjába. A sejtmagba jutva a T-DNS az integrációs pontig érve megszabadul kísérő fehérjétől és integrálódik a gazda genomjába (4. ábra) (Tzfira & Citovsky 2006). A T-DNS régiót két 25 bázispár hosszúságú szekvencia határolja (LB-left border és RB-right border), melyek fontos szerepet töltenek be a T-DNS plazmidból történő kivágódásában (Bhojwani & Dantu 2013).

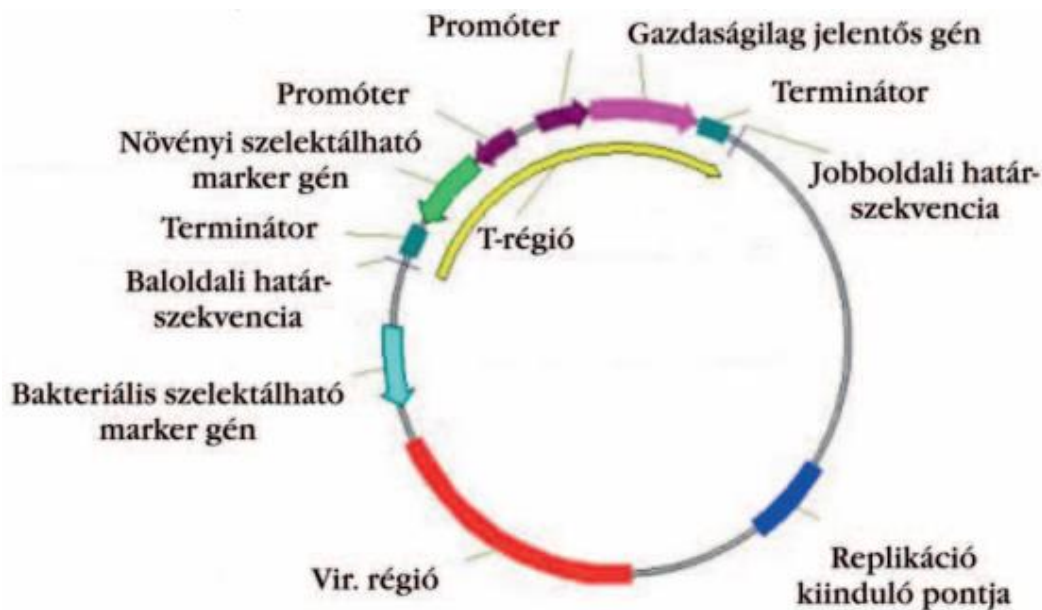
Kutatók olyan rekombináns *Agrobacterium* törzseket hoztak létre, amelyekben a T-DNS-t más génekkel helyettesítették. Ma ez a leghatékonyabb módszer idegen gének bevitelére a növények körében.



**4. ábra: Az Agrobacterium által közvetített genetikai transzformáció modellje.** A folyamat 10 lépésből áll. 1) Az agrobaktérium felismeri a gazdasejtet és hozzá kapcsolódik. 2) Az agrobaktérium érzékeli a specifikus növényi jeleket a VirA/VirG kétkomponensű szignáltranszdukciós útvonalon keresztül. 3) A Ti-plazmid Vir régiója aktiválódik, ami következtében 4) VirD1/D2 fehérjekomplex segítségével a T-DNS egy mobil kópiája keletkezik. 5) Az éretlen T-komplex a gazdasejt citoplazmájába kerül. 6) A gazdasejt citoplazmájában érett T-komplex képződik. 7) Az érett T-komplex a gazdasejt sejtmagjába importálódik. 8) A sejtmagban a T-DNS az integrációhoz pontjához vándorol és 9) megszabadul a kísérő fehérjéitől. 10) A T-DNS integrálódik a gazdasejt genomjába (Tzfira és Citovsky 2006 nyomán).

Az *Agrobacterium tumefaciens* egy természetes módon előforduló baktérium, amely képes átadni a Ti (tumor-indukáló) plazmidjának részeként hordozott T-DNS (transzfer DNS) molekulákat a növényi sejtekbe, és ezáltal genetikai információt szállítani. Az *Agrobacterium* által a növényi sejtekbe átvitt T-DNS molekula körül található jobboldali és baloldali (LB-left border és RB-right border) határszekvenciák határozzák meg, hogy a plazmid melyik részei

kerülnek integrálásra a növényi sejt genomjába. (Gelvin 2003) Ahhoz, hogy a T-DNS-be hatékonyan be lehessen építeni a számunkra fontos géneket, a plazmidból először ki kell vágni a tumor indukáló géneket. A vir génekre továbbra is szükség van, hiszek ezek felelősek a T-DNS gazdasejtbe való integrációjáért. A kutatók létrehoztak olyan változatokat is, ahol a Ti plazmidon több vir gén található, mint a természetes változatban, ezáltal a T-DNS beépülés még hatékonyabb (5. ábra). Léteznek úgynevezett bináris vektorok is, amelyek képesek *E. coli*-ban is replikálódni. Az *Agrobacterium* bináris klónok előállítása és manipulálása is könnyebb, mint a hagyományos transzformációs vektoroké (Bhojwani & Dantu 2013).



5. ábra: Ti plazmid átalakításával létrehozott expressziós vektor (Heszky 2011)

Az árpa transzformációjának hatékonysága nagymértékben függ az alkalmazott protokolltól, az *Agrobacterium* törzstől, a használt árpa fajtától és más körülményektől. Az erre irányuló kutatások azt mutatják, hogy az *Agrobacterium* AGL1 törzs a leghatékonyabb az árpa transzformációjára. A legjobb eredmény 'Golden Promise' árpa felhasználásával érhető el, mégpedig éretlen embriók fertőzésével (Harwood 2014).

### 2.3 Agrobaktérium közvetített WDV átvitel

A mastrevírusok mechanikusan nem terjeszthetők, ezért kizárólag rovarvektorral vagy *Agrobacterium tumefaciens* által juttathatók be a növényi sejtekbe. Ezt a folyamatot más néven agroinokulációnak is hívják. Ezeket az úgynevezett agrofertőző klónokat úgy hozzák létre, hogy egy 1,5-szeres WDV genomot építenek a Ti-plazmidba. Miután a transzformációs

vektor megfertőzi a sejtet a 1,5-szeres WDV genom bejut a sejtbe és mivel komplementer szekvenciákat tartalmaz, így a két vége homológ rekombinációval összekapcsolódik. Így jön létre egy egyszeres cirkuláris WDV genom a gazdasejtben (Ramsell et al. 2009).

A kutatások során az agrofertőző konstrukciókra azért is van szükség, hogy tudjuk pontosan milyen WDV törzset használunk. A természetben gyűjtött kabócák különböző WDV törzseket tartalmazhatnak egyszerre. Az ismert nukleotid szekvenciájú törzsszel való munka megkönnyíti a tesztek kivitelezését és az eredmények értelmezését.

Ahhoz, hogy sikeres WDV fertőzést hozzunk létre agrobaktérium segítségével, első lépésként egy fertőző klónt kell létrehoznunk. Ebben az esetben egy másfélszeres (1,5 MER) vírus DNS-t kell a plazmid vektorba klónozni. Amennyiben csak egyszeres vírus DNS lenne a vektorba klónozva, úgy a vírus DNS nem tudna cirkuláris DNS-é alakulni, ebből kifolyólag nem tudna sokszorozódni. A megoldás, hogy 1,5-szeres vírus genomot helyeznek a plazmidba, ami lehetővé teszi, hogy homológ rekombinációval újra létre jöjjön a vírus cirkuláris DNS-e. Ez az egyszeres cirkuláris WDV DNS már képes szaporodni a növényi sejtmagban (Dale et al. 1989). Ramsell és munkatársai kidolgoztak egy módszert gabonanövények WDV fertőzésére *Agrobacterium* (AGL1) közvetítésével, amely árpa, búza, rozs és zab transzformációjára is alkalmas. A magokat steril vízben kell áztatni egy éjszakán keresztül, hogy a maghéj megpuhuljon. Táptalajon felnevesztett *A. tumefaciens*-be kell mártani a magokat úgy, hogy az embrió körül borítsa be a baktérium réteg. Ezután a magot a baktériummal borított rétegen keresztül különböző szögekben 1-5 alkalommal tüvel megszúrták. Az agroinokuláció után a magokat egy éjszakára 28 °C-os sötét szobába helyezték, majd a következő napon kiültették. Az így kezelt növények négy hét elteltével 6-29%-ban voltak WDV fertőzöttek (Ramsell et al. 2009).

## 2.4 A növényi RNS interferencia

Amerikai kutatók 1993-ban a Harvard Egyetemen (ma University of Massachusetts Medical School) felfedeztek egy 22 nukleotid hosszúságú kis RNS-molekulát fonálférgekben (*Caenorhabditis elegans*). Ez a molekula a lin-4, amely elengedhetetlen a korai fejlődési változások szabályozásában azáltal, hogy a LIN-14 fehérje expresszióját blokkolja. Ez az első dokumentált és azonosított mikroRNS (miRNS) az irodalomban (Lee et al. 1993). Azonban, ez a kis RNS-molekula nem keltett különösebb figyelmet a tudósok körében mindaddig, amíg 2001-ben három kis RNS-ekről szóló cikket is publikáltak Science ugyanazon számában. Ezekben a cikkekben nemcsak a *C. elegans*-ban, hanem más gerinctelenekben és

gerincesekben is azonosítottak számos kis RNS-t (Lagos-Quintana et al. 2001, Lau et al. 2001, Lee and Ambros 2001). A következő évben rengeteg miRNS-t azonosítottak különböző növényfajokban, többek között arabidopsisban (*Arabidopsis thaliana*) és a rizsben (*Oryza sativa*). Felfedezték a miRNS-ek fontos szerepét a növény fejlődésében és morfológiájában is (Reinhart et al. 2002).

Az RNS interferenciát (RNSi) azóta is széles körben kutatják és alkalmazzák az orvostudományban, az állattenyésztésben, a növénytermesztésben és a biotechnológiai iparban. Az RNSi lehetővé teszi a célzott génkiütést, amelynek során specifikus gének kifejeződését lehet csökkenteni, így fontos eszköz lehet a génfunkciók feltárásában és a betegségek kezelésében. Az utóbbi években az újgenerációs szekvenálásnak és a fejlett bioinformatikának köszönhetően a miRNS-ekkel kapcsolatos tanulmányok és az azonosított miRNS-ek száma drámaian megnövekedett (Zhang & Wang 2015).

A növényi RNSi egy természetes génregulációs mechanizmus, amely a növényi sejtekben előforduló kis RNS molekuláknak (small RNA, sRNA) a célgénjeikre gyakorolt hatásával működik. Az RNSi folyamata során az sRNS-k képesek befolyásolni a gének kifejeződését, csökkentve vagy növelve a génaktivitást a sejt szükségleteinek megfelelően. Az RNSi lehetővé teszi a sejtek számára, hogy az adaptív válaszként reagáljanak a különböző környezeti hatásokra, például a vírusokra és a kórokozókra. (Muhammad et al. 2019). Ebből kifolyólag a növényi RNS interferencia folyamatát számos kutatás és fejlesztés használja a növények genetikai manipulációja során, amely magában foglalja a kórokozókkal és kártevőkkel szembeni rezisztencia kialakítását, valamint a növények agronómiai tulajdonságainak javítását és optimalizálását a termelési kapacitás, vagy minőség tekintetében (Zhang & Wang 2015).

A növényi RNSi fő útvonalai:

1. Transzkripció gátlás (TGS): különböző sRNS molekulák megváltoztatják a DNS metilációs állapotát, ezáltal befolyásolják a célgén kifejeződését.
2. Poszt-transzkripció gátlás (PTGS: ebben az esetben rövid sRNS molekulák (mikroRNS-ek vagy kis interferáló RNS-ek) jönnek létre, amelyek komplementerek bizonyos messenger RNS (mRNS) molekulával. Ezáltal hozzá tudnak kapcsolódni és gátolják a mRNS fordítását fehérjékké, vagy az mRNS-t elhasítják.

Ezek az útvonalak számos mechanizmussal kombinálva működhetnek, és együtt hozzájárulnak a növényi RNS interferencia széleskörű szabályozási hatásaihoz (Guo et al.

2016). Növény-patogén interakciók során a növényeknek meg kell védeniük magukat, így válaszként aktiválják a különböző védekezési mechanizmusait. Az RNS interferencia (RNSi) egy kulcsfontosságú biológiai folyamat ilyen esetekben, azonban a kórokozók anti-csendesítő mechanizmust aktiválhatnak a gazdanövény RNSi blokkolására. A csendesítő mechanizmus megzavarása a kórokozók rendkívül fejlett virulenciastratégiája (Muhammad et al. 2019). A WDV replikáz enzime is egy ilyen RNSi szupresszor, amely képes megkötni a növény által a vírusra létrehozott siRNS-eket, gátolva ezáltal a növény védekezési mechanizmusát (Wang et al. 2014).

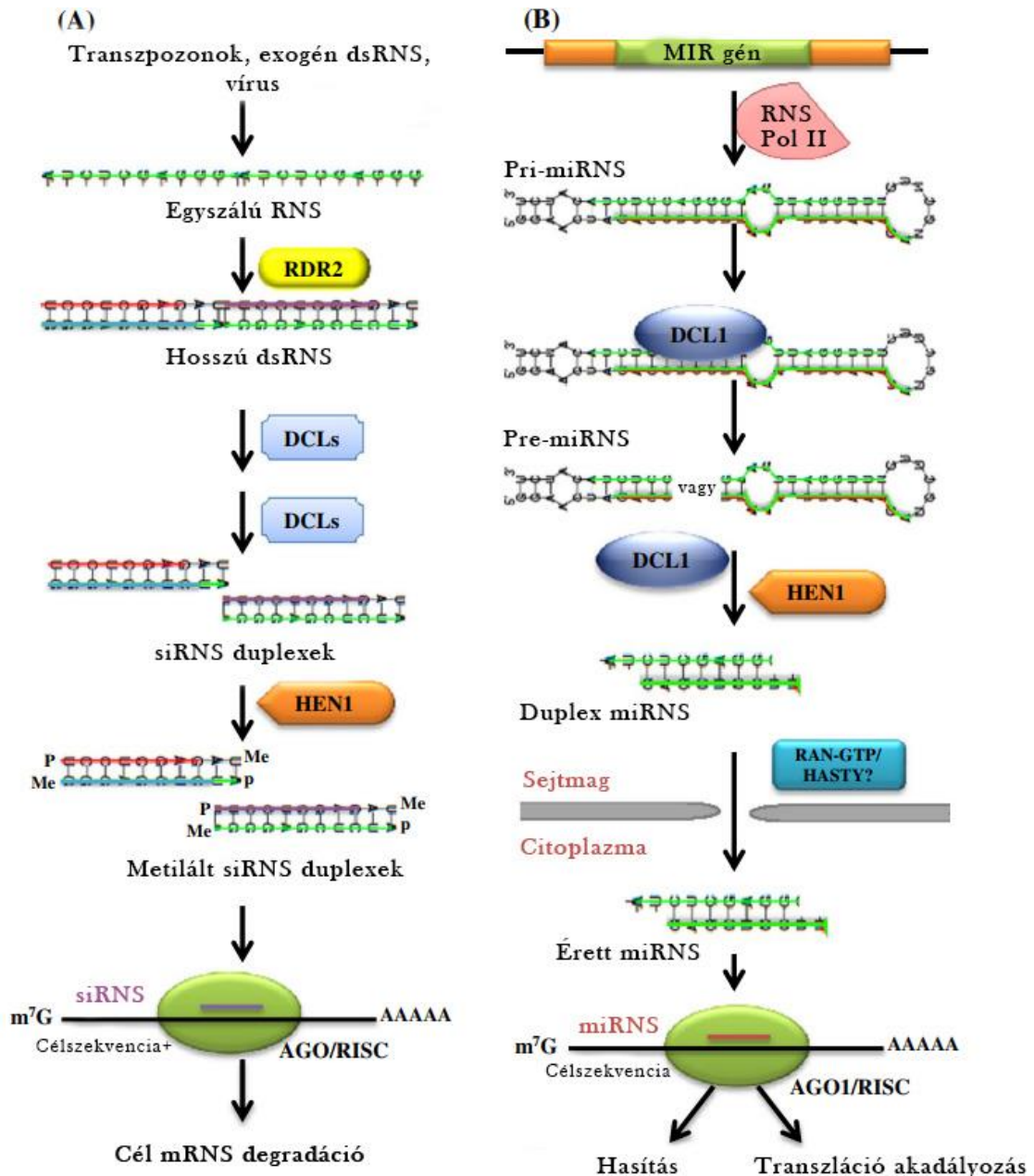
#### **2.4.1 A kis interferáló RNS-ek és mikroRNS-ek működése**

A siRNS (kis interferáló RNS) és miRNS (mikro RNS) molekulák mind ~20-24 nt hosszúságú kis RNS fragmentumok, amelyek fontos szerepet játszanak sejtek génexpressziójának finomhangolásában, az élettani folyamatok szabályozásában vagy a kórokozókkal szembeni védekezésben. Azonban a két típus kialakulásában és funkciójában is eltér egymástól. Méretüket tekintve nagyon hasonlóak, a siRNS-ek általában 20-25 nukleotid hosszúak, míg a miRNS-ek 21-23 nukleotid hosszú molekulák. Ezek a kis nem kódoló RNS-ek számos úton létrejöhetnek, olyan speciális enzimek által, amelyek az RNS átiratokat dolgozzák fel. Ezeket processzor fehérjéknek is nevezik és nukleáz aktivitással képesek kimetszeni a kis RNS-eket az elsődleges RNS-transzkriptumokból. Ezt a hatásmechanizmust olyan effektor fehérjék is támogatják, amelyek a nagy molekulatömegű fehérje-RNS komplexek összetevői. Az effektorok feladata a kis RNS-ek stabilizálása, szállítása és szabályozása (Costa et al. 2012). A miRNS-ek mindig endogén módon létrejött dsRNS-ekből keletkeznek, míg a siRNS-ek létrejöhetnek endogén és exogén módon képződött dsRNS-ekről egyaránt (Bartel 2004). A siRNS-ek kialakulása egy növényi sejtben történhet exogén úton is, ilyenkor ezek a molekulák egy vírusfertőzés elleni genetikai védelmi mechanizmusban vesznek részt (Costa et al. 2012).

A miRNS-ek és siRNS-ek a növényi genomon belül általában az intergénikus régiókban vannak kódolva, de előfordulhatnak a fehérjét kódoló gének intronikus régióiban is. A növényi miRNS-ek kialakulása több lépésben történik. A sejtben az RNS-polimeráz II által előállított pri-miRNS molekulák képződnek, majd azután enzimek (Dicer) segítségével egy pre-miRNS molekula jön létre. A pre-miRNS molekulák egyes részletei egymással komplementerek, így egy hajtű szerkezet alakul ki. Ezután a miRNS / miRNS \* duplex a sejtben a citoplazmába kerül, ahol enzimek (Dicer, HYL1) segítségével általában egy funkcióképes érett miRNS képződik. (Xie et al. 2015). Az siRNS molekulák keletkezhetnek

endogén vagy exogén kettős szálú RNS molekulákról. Ezeket a hosszú és változatos dsRNS molekulákat a DCL (Dicer-like) endonukleázok 20-25 nt hosszúságú darabokra vágják. Egy dsRNS-ből több különböző siRNS keletkezhet (6. ábra) (Costa et al. 2012).

A növényi sejtekben a kis RNS-ek hatékonysága azon múlik, hogy a célszekvencia mennyire komplementer a kis RNS-sel. Ideális esetben teljes mértékben komplementer, viszont amennyiben nem, úgy több különböző kis RNS molekulára is szükség lehet a kívánt csendesítési hatékonyság eléréséhez. A miRNS-ek az RNS által indukált csendesítő komplex (RISC) által fejtik ki hatásukat. A citoplazmában található érett miRNS-ek két szála közül az egyik a funkcionális szál, amely a RISC-komplexbe kerül, a másik a komplementer szál (miRNS\*), amely általában lebomlik. Az érett RISC-komplexek a komplementer szekvenciákkal rendelkező mRNA transzkriptekhez kapcsolódnak és azok elhasításával, vagy a transzláció akadályozásával csendesítik azokat. A kis interferáló RNS-ek (siRNS) hatásmechanizmusa hasonló, esetükben az összeszerelődött RISC-komplexek a velük komplementer virális RNS-ek lebontását is okozhatják (Costa et al. 2012).



6. ábra: Kis RNS-ek keletkezése A) siRNS útvonal B) miRNS útvonal (Tiwari et al. 2014 nyomán)

Érdemes megemlíteni, hogy a környezeti hőmérséklet nagy mértékben befolyásolja a növény-vírus kölcsönhatásokat. A növényi vírus járványokat gyakran az alacsony hőmérséklettel hozzák összefüggésbe, míg magasabb hőmérsékleten a vírusos tünetek mérséklődnek. Ennek az lehet az oka, hogy a vírusok elleni védekezésben nagy szerepet játszó siRNS-ek képződése 15 °C alatt elmarad, míg miRNS-ek továbbra is termelődnek (Szittyá et al. 2003).

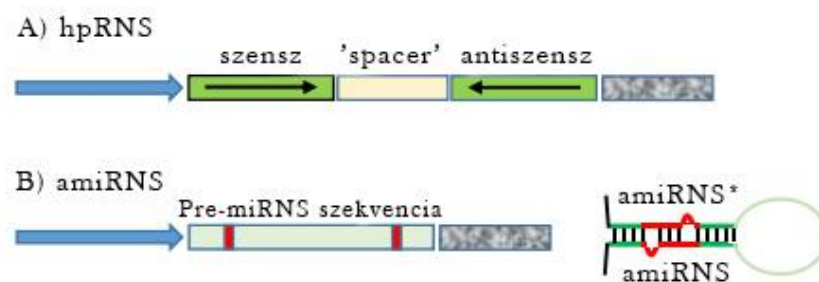
#### 2.4.2 Mesterséges miRNS (amiRNS) technológia

A növényekben dsRNS-ek által indukált géncsenedesítést és az sRNS-ek különböző útvonalait 1998-ban fedezték fel. Azóta számos transzgén vagy vírus alapú géncsenedesítési technológiát fejlesztettek ki. Az RNS csenedesítési módszerek közül kiemelkedően elterjedtek a hpRNS (hajtű RNS; hairpin RNA) és a mesterséges miRNS (amiRNS; artificial micro RNA) technikák. Ezeket az RNS csenedesítő technikákat már régóta használják a mezőgazdaságban kultúrnövények genetikai fejlesztésére. Ilyen fejlesztések lehetnek például a betegségekkel és a kártevőkkel szembeni ellenállás növelése, a növény morfológiai tulajdonságainak megváltoztatása, virágzási idő hosszabbítása, gyümölcsök és virágok kereskedelmileg hasznos tulajdonságainak javítása, tápérték növelése, valamint mérgező vegyületek és allergének eliminálása (Guo et al. 2016). A mesterséges miRNS technológia használata segíthet az olyan stressz tényezőkkel szembeni ellenállóság fokozásában is, mint a szárazság, a hideg vagy a só stressz (Zhang & Wang 2015).

Az elmúlt évtizedben több adatbázist és programot is létrehoztak a miRNS-ek és célszekvenciáik azonosítására. Ilyen adatbázis például a miRBase, amely minden publikált miRNS szekvenciát tartalmaz mindenféle organizmusokból. A PMRD (plant microRNA database) egy kifejezetten növényi miRNS adatbázis. A  $\mu$ PC (MicroPC) pedig egy olyan program, amely potenciális növényi miRNS-eket keres és összehasonlításukat végzi. A felsoroltakon kívül számos adatbázis áll még rendelkezésre, amelyek hasznosak lehetnek a kutatók számára a génkifejeződés szabályozásának vizsgálatában. (Zhang & Wang 2015).

Az inverted repeat (IR) vagy hairpin RNS (hpRNS) transzgén technológia egy olyan génmódosítási technika, amely RNS-interferencia alapú génkioltásra szolgál. Egy tipikus hairpin RNS transzgén konstrukció tartalmazza a csenedesíteni kívánt gén egy szakaszának szensz és antiszensz szálát fordítottan ismétlődő (inverted repeat) formában. A szensz és az antiszensz szál kódja egy 'spacer' régióval van elválasztva (7. ábra). Amennyiben erről a szakaszból mRNS képződik, úgy az saját komplementaritása miatt egy hajtű (hairpin) szerkezetet vesz fel. Ezután a hpRNS molekula bekapcsolódik az RNSi útvonalakba. A hpRNS-konstrukciókat viszonylag nehéz előállítani a fordítottan ismétlődő szerkezet miatt, habár a kutatók a molekuláris munkák megkönnyítése céljából kifejlesztettek néhány jól működő hpRNS klónozó vektort (pHannibal; pHellsgate) (Guo et al. 2016).

Az amiRNS technológia előnye a hairpin RNS technológiával szemben az, hogy célzottabban képesek a génexpresszió szabályozására. Ennek oka az, hogy az amiRNS-ek nagyobb specifitással rendelkeznek, mert egy amiRNS konstrukcióról csak egy amiRNS keletkezik így kevésbé valószínű, hogy a célsejtben más génekre is hatással. A célsejtben más génekre irányuló off-target hatás nem csak kevésbé valószínű, de viszonylag könnyen ellenőrizhető is. Ezzel szemben egy hpRNS konstrukcióról sok különböző siRNS keletkezhet, ez növeli az off-target hatást, ami befolyással lehet a sejt homeosztázisára. Habár az amiRNS konstrukciók tervezése nagyobb körültekintést és odafigyelést igényel, eredményesebb és specifikusabb génexpresszió szabályozást tesz lehetővé. Több tanulmány is azt mutatja, hogy az amiRNS-ek hatékonysága analóg az endogén miRNS-ekkel. Egyediségének, hatékonyságának és pontosságának köszönhetően amiRNS-eken keresztüli géncsendesítés második generációs RNS interferencia technológiának is tekinthető (Tiwari et al. 2014).



**7. ábra: A hpRNS és az amiRNS konstrukciók sematikus ábrája:** A) A hpRNS (hairpin RNS) sematikus ábrája. A célgén zöld színnel, a promóter kék nyíllal, a spacer régió sárga színnel és a terminátor régió szürke színnel van jelölve. B) Az amiRNS (artificial mikro RNS) sematikus ábrája. A pre-miRNS szekvencia zöld színnel, az amiRNS és amiRNS\* szekvenciák piros színnel, a promóter kék nyíllal és a terminátor régió szürke színnel vannak feltüntetve. A megjósolt amiRNS szerkezete is látható (Guo et al. 2016 nyomán).

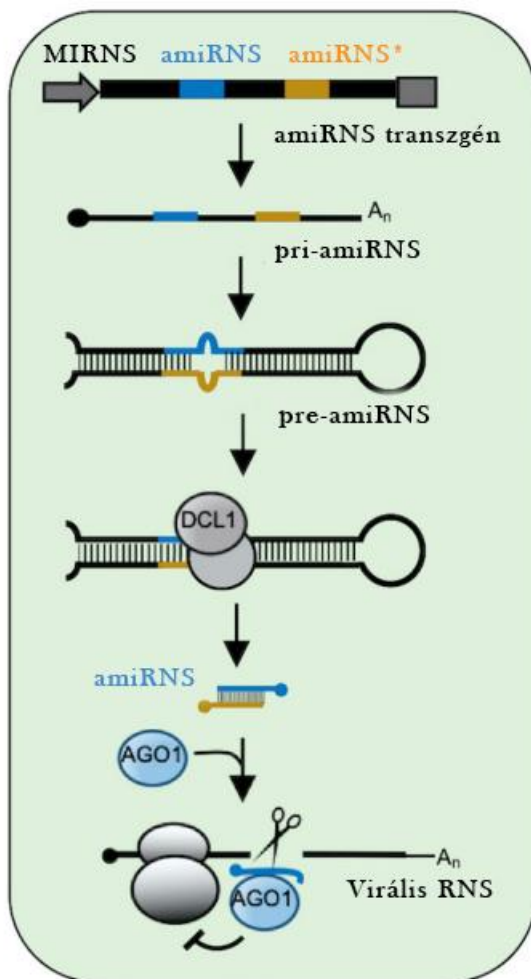
Az amiRNS-ek a miRNS-ekhez hasonlóan egy egyszálú ~21 nukleotid hosszúságú RNS molekulák, amelyek képesek becsatlakozni az RNS interferencia útvonalakba. Egy amiRNS konstrukció létrehozásakor egy természetes miRNS prekursor miRNS és miRNS\* szekvenciáit a megfelelő célgén szekvenciáira cserélik (amiRNS:amiRNS\*); a módosított

amiRNS prekursorban a miRNS prekursor eredeti másodlagos szerkezete megmarad. Az amiRNS-ek biogenezisének útvonala megegyezik a miRNS-ek biogenezisének útvonalával, így minden szükséges kulcsenzim rendelkezésre áll a sejtben (Guo et al. 2016). Az amiRNS szekvenciák tervezésekor és kiválasztásakor érdemes néhány szempontot figyelembe venni. Fontos, hogy a cél RNS 5' végétől nézve az amiRNS szekvencia 2. és 12. nukleotid pozíciója között lehetőleg ne legyen illeszkedési hiba. Hasonlóképpen a 10. és 11. nukleotid pozícióban is fontos a tökéletes bázispárosodás, hiszen feltehetőleg itt hasít az AGO1 fehérje. Amennyiben itt illeszkedési hiba van, úgy az amiRNS-ünk nem tudja elhasítani a célgént (Schwab et al. 2006). Bizonyos miRNS családokat egyszerűbb másodlagos szerkezetük miatt gyakran használnak az amiRNS által közvetített géncsendesítés során. Kutatások során előnyben részesítik az ath-miR159a, ath-miR167b, ath-miR169d, ath-miR171a, ath-miR172a, ath-319a, osa-miR528 és osa-miR395 miRNS családokat (Tiwari et al. 2014).

A policisztronikus amiRNS egy olyan génexpresszió-szabályozó technológia, amely több különböző célgén lecsendesítésére is alkalmas lehet, vagy hatékonyság növelése céljából egy adott gént több amiRNS célozhat. Ez a technológia úgy működik, hogy több különböző amiRNS prekuzort helyeznek el egyetlen policisztronikus konstrukcióba, amely egyetlen promóter által szabályozott, így egyszerre több gént is célba lehet vele venni. A policisztronikus amiRNS technológia lehetővé teszi a hatékonyabb géncsendesítést, ami a növényekben hasznos lehet a kórokozók elleni védekezésben vagy a termésnövelésben. Ráadásul a policisztronikus amiRNS technológia minimalizálja az ismételt transzformációk nehézségeit is azáltal, hogy lehetővé teszi az egyetlen vektorban több amiRNS gén kifejezését. Ez azt jelenti, hogy különböző célgének elnyomásához nem kell külön-külön több amiRNS prekuzort transzformálni a növénybe, hanem egyetlen vektort kell bejuttatni, amely tartalmazza az összes szükséges szekvenciát (Fahim et al. 2012).

Az amiRNS alapú technikák hatékonyan képesek elnyomni a vírusok replikációját és terjedését a növényekben. Az amiRNS technológia nagyfokú célzottsága lehetővé teszi a vírusok által kódolt gének specifikus elnyomását, miközben minimalizálja a nem kívánt hatásokat (8. ábra) (Cisneros & Carbonell 2020). Az technológiát növényekben legelőször 2006-ban alkalmazták endogén gének csendesítésére *Arabidopsis thaliana*-ban (Schwab et al. 2006). Nem sokkal később szintén *Arabidopsis thaliana* növényeken kísérletezve olyan transzgénikus egyedeket hoztak létre, amelyek képesek voltak tarlórépa sárga mozaik (TYMV) és tarlórépa mozaik potyvírusok (TuMV) ellen amiRNS-eket termelni (Fahim et al. 2012). A vegyes vírusfertőzések gyakoriak a mezőgazdasági kultúrnövényekben. A

policisztronikus amiRNS technológia használatával lehetséges több vírus erősen konzervált régióinak egyidejű célzása (Muhammad et al. 2019). A különböző amiRNS technológiák azért is lehetnek hatékonyabbak fertőzések ellen, hiszen a miRNS/amiRNS biogenezis útvonalak 15 °C alatt is működnek, míg a siRNS-ek képződése elmarad (Szittyá et al. 2003). A közelmúltban Magyarországon már sikerült olyan transzgénikus árpa növényeket előállítani, amelyek WDV-vel szemben extrém rezisztenciát mutatnak. A kutatás során azt is bizonyították, hogy a rezisztencia szintje korrelált az amiRNS-ek expressziós szintjével. Kísérleteik azt is kimutatták, hogy az amiRNS technológia képes szabályozni egy DNS-vírus replikációját árpában, még a szántóföldi fertőzési körülményekhez hasonló alacsony hőmérsékleten is (Kis et al. 2015).



**8. ábra: Az antivirális amiRNS-útvonal:** Az amiRNS transzgén egy monocisztronos miRNS-prekurzort expresszál, amely szekvenciálisan egy amiRNS-sé alakul. Az érett amiRNS célpontja a vírus RNS egy szakasza (Cisneros & Carbonell 2020 nyomán).

Amikor vírusrezisztens növényt szeretnénk létrehozni, figyelembe kell venni azt is, hogy a kórokozók gyorsan tudnak adaptálódni. Ahhoz, hogy ennek az evolúciónak a kockázatát minimálisra csökkentsük érdemes több amiRNS-t alkalmazni, amelyek a vírusgenom különböző konzervatív régióit célozzák meg (Kis et al. 2015).

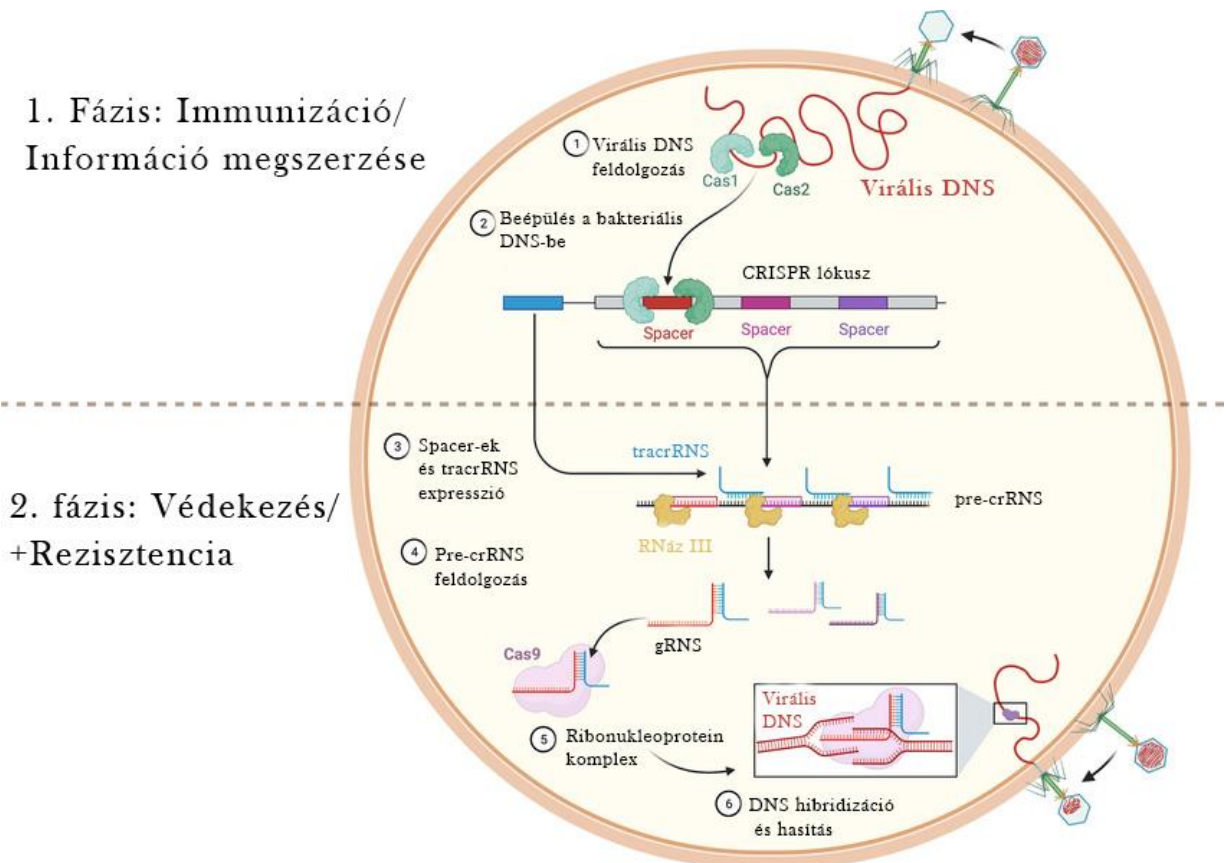
## **2.5 A CRISPR/Cas9 technológia**

A CRISPR/Cas9 technológia felfedezése során baktériumokat vizsgáltak, hogy megértsék, hogyan védekeznek a vírusok ellen. Már korábban is tudták, hogy a baktériumoknak van egy adaptív immunrendszere, amely képes felismerni és elpusztítani a vírusokat. A kutatók arra voltak kíváncsiak, hogy pontosan hogyan működik ez az immunrendszer (Bortesi & Fischer 2015).

A CRISPR/Cas9 technológiát Jennifer Doudna és Emmanuelle Charpentier fejlesztette ki. A két kutató 2012-ben fedezte fel a Cas9 enzim DNS-vágási képességét, majd 2014-ben közösen publikáltak egy tanulmányt, amely leírta a Cas9 enzim működését (Doudna & Charpentier 2014). A kutatásuk eredményeként létrejött a CRISPR/Cas9 technológia, amely a genetikai kutatások és az orvostudomány területén is forradalmi változásokat hozott. A kutatócsoport 2020-ban elnyerte a Kémiai Nobel-díjat a CRISPR/Cas9 technológia kifejlesztéséért.

A CRISPR/Cas9 rendszer egy természetes védelmi mechanizmus, amelyet a baktériumok és az archaeák alkalmaznak kórokozók elleni védekezésre. A CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) egy olyan genomikus mintázat, amely ismétlődő, rövid palindróm szekvenciákból és közöttük változó "spacers" szekvenciákból áll. Az újonnan bejutó idegen DNS-ből származó spacer szekvenciák integrálódnak a CRISPR lókuszbba, ezzel később elősegítve a kórokozók felismerését és elpusztítását. Fertőzés során a CRISPR lókuszt átírják és az így keletkező CRISPR RNS (crRNS) molekulák tartalmazzák a baktérium által korábban beépített spacer szekvenciákat. A crRNS molekulák körülbelül 40 nukleotid hosszú molekulák. A crRNS-ek később összekapcsolódnak egy másik RNS molekulával, az úgynevezett transzaktiváló CRISPR RNS-sel (tracrRNS). Az így kapott komplex aktiválja és irányítja a Cas9 enzimet. A Cas9 enzim megtalálja a célzott DNS szakaszt, amelyet a crRNS által meghatározott szekvencia alapján azonosít. A Cas9 enzimnek szüksége van egy specifikus szekvenciára, amelyet protospacer-nak neveznek, valamint egy PAM (protospacer adjacent motif) szekvenciára, amely azonosítja a célpont helyét. A cél DNS mellett található PAM motívum általában 5'-

NGG-3' szekvenciával rendelkező konzervált szakasz. a CRISPR/Cas9 rendszerben a Cas9 fehérje crRNS segítségével találja meg a hasítási célpontot a DNS-ben. A cél DNS crRNS-el komplementer szakaszát a Cas9 fehérje felismeri, majd a tracrRNS segítségével a célgéntől 3 bázispár távolságra található PAM motívumot azonosítja. Ezután a Cas9 fehérje 'lehorgonyzik' és a DNS mindkét szálát elvágja (9. ábra). Amennyiben a PAM mellett található 'seed régió'-ban mutáció következik be, úgy a hasítás általában elmarad (Bortesi & Fischer 2015).



**9. ábra: A baktériumok CRISPR-Cas9 rendszere és az adaptív immunválasz a behatoló baktériofágokkal szemben.** A fertőzés után (1. fázis), a Cas1 és Cas2 fehérjék a vírus genomjának rövid szakaszait rögzítik a baktérium CRISPR lókuszában. A második fázisban a CRISPR lókuszt expresszálódik és ezáltal pre-crRNS-ek illetve tracrRNS-ek jönnek létre. A pre-crRNS gondoskodik a gRNS-ek előállításáról, amelyek a Cas9 fehérjéhez kötődnek. A Cas 9 fehérjék célzottan megtámadják és hasítják a beáramló baktériofág genomjának komplementer szekvenciáit (Ghorbani et al. 2021 nyomán)

A CRISPR/Cas rendszer átmenete a biológiai jelenségtől a génmódosító eszköz felé akkor történt meg, amikor kimutatták, hogy a cél DNS szekvenciája viszonylag egyszerűen átprogramozható. A cél DNS szekvenciáját egyszerűen lehet átprogramozni a crRNS 20 nukleotidjának (spacer) módosításával. A tracrRNS:crRNS szerkezetet egyetlen guide (irányító) RNS-re (single-guide RNS; sgRNS) módosították, amely megtartotta a két kritikus tulajdonságot: a 20 nukleotid hosszú szekvenciát az sgRNS 5' végén, amely a Watson-Crick bázispárosodás révén meghatározza a cél DNS-t, valamint kialakítanak egy speciális másodlagos szerkezetet a sgRNS szekvencia 3' végén, amely kapcsolódik a Cas9-hez. Ezzel a rendszert a korábbi háromról két komponensűre redukálták. Rövid idővel később, öt független kutatócsoport mutatta be, hogy a két komponensű rendszer működőképes eukariótákban (ember, egér és zebradánió) is, amely azt jelzi, hogy a CRISPR gének funkciói endogén eukarióta enzimek által támogatottak. Lényegében egy egyszerű két komponensű rendszert hoztak létre, amelynek segítségével az sgRNS spacer régiója nukleotid sorrendjének módosításával a CRISPR-Cas9 rendszerrel bármilyen számunkra érdekes DNS részletet lehet programozni, amennyiben az PAM mellett helyezkedik el (Doudna & Charpentier 2014). A leggyakrabban használt rendszer a II. típusú CRISPR/Cas9 rendszer, amely *Streptococcus pyogenes*-ből izolált géneket tartalmaz (Bortesi & Fischer 2015).

Amennyiben a CRISPR/Cas9 rendszert a genom szerkesztésére használják, akkor az enzim nem csak hasítja a bizonyos DNS szakaszt, hanem a sejt hibajavító mechanizmusai meg is változtatják. Ez a módosítás lehet például a gén módosítása vagy kikapcsolása, ami a kívánt fenotípus változását eredményezi. Azonban a CRISPR/Cas9 technológia használata kapcsán felmerülnek bizonyos etikai kérdések is. Például a génmódosítás a születendő gyermek kiválasztása során is alkalmazható, ami számos erkölcsi és társadalmi kérdést vet fel (Ghorbani et al. 2021).

Növények esetében a CRISPR/Cas9 konstrukció sejtmagba juttatására az *Agrobacterium* által közvetített transzformáció a legelterjedtebb módszer. Az exogén T-DNS, amely a Cas9-et és a gRNS-t hordozza a Ti plazmidon található. Ezt a módszert már sikeresen alkalmazták erre a célra több mint 20 növényfajban (Tsanova et al. 2021).

A CRISPR/Cas9 technológia elterjedt módszer vírusok elleni immunitás kialakítására is növényekben. Mivel a CRISPR/Cas9 rendszer prokarióta eredetű, a növényi vírusok kevésbé valószínű, hogy olyan mechanizmusokat fejlesztenek ki, amelyek ellene hatékonyak lennének. Ezzel ellentétben az RNS interferenciával, amely növényekben is megtalálható

útvonala, és amely ellen a legtöbb vírusnak már van védekezési stratégiája. A több célpontú guide RNS (gRNS) hatékony módszer lehet az olyan mutáns vírusok eliminálására, amelyek CRISPR/Cas9-alapú genomszerkesztés miatt alakulnak ki. Különböző növényfajokban különböző vírusok ellen már sikeresen alakítottak ki immunitást CRISPR/Cas9 technológiával (1. sz. melléklet) (Khan et al. 2022).

Kis és munkatársai 2019-es publikációjukban arról számoltak be, hogy CRISPR/Cas9 technológiával nagyon hatékony WDV rezisztenciát lehet kialakítani árpa növényekben. Kutatásuk során agroinokulációval egy olyan konstrukciót juttattak a növényi sejtekbe, amely négy guide RNS-t tartalmazott, melyek a vírus különböző genomi pozícióját célozták. Az így létrehozott transzgénikus növények RT-PCR vizsgálatával kimutatták, hogy a négy guide RNS közül csak három expresszálódik. A rovarvektoros WDV fertőzést követően arra jutottak, hogy CRISPR/Cas9 rendszerrel extrém hatékony rezisztencia érhető el árpában. Ugyanakkor a fertőzés során mutációkat azonosítottak a CRISPR/Cas9 célszekvenciában. A mutáns WDV törzsek genomját megszekvenálva azt fedezték fel, hogy kizárólag az sg2 guide RNS célhelyén találhatók mutációk, míg a többi guide RNS célhelyén egy esetben sem. Ezen eredményből arra következtettek, hogy csak az sg2 guide RNS volt működőképes (Kis et al. 2019).

Egy további alkalmazása a CRISPR/Cas9 technológiának, amely valószínűleg a jövőben egyre szélesebb körökben elterjedtebb lesz, az a célzott transzgén beillesztése, ahol növényeket vagy növényi sejteket használnak biológiai gyárakként bizonyos metabolitok vagy fehérjék előállítására (Bortesi & Fischer 2015).

### 3. Anyag és módszer

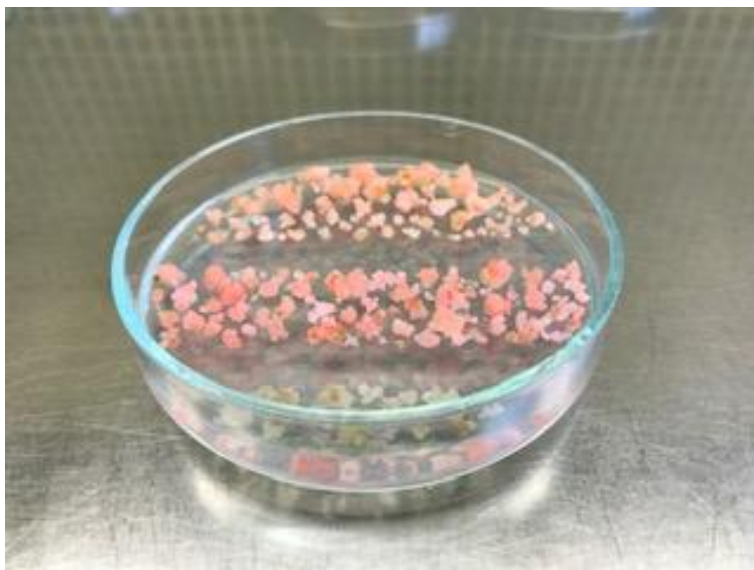
#### 3.1 Növényi anyag és vírusvektorok nevelése

A kísérleteinkhez felhasznált árpa (*Hordeum vulgare* cv. 'Golden Promise') növényeket növénynevelő kamrákban (Versatile Environmental Test Chambers; Sanyo, Tokyo Japan) neveltük. A nevelést 16 órás nappali (15°C, 50  $\mu$ E m-2s-1 fényerősség) és 8 órás éjszakai (12 °C, sötét) ciklus alkalmazásával végeztük.

Az árpaföldekről begyűjtött, kifejlett csíkos gabonakabóca (*Psammotettix alienus* Dhalbom) populációt 23 °C hőmérsékletű növénynevelő kamrában több nemzedéken át neveltük árpa növényeken (*H. vulgare* cv. 'MV Jubilant') 14 órás nappali (50  $\mu$ E m-2s-1 fény) és 10 órás éjszakai periódust váltakoztatva. A rovarokat a külvilágtól egy vékony, 0,1 mm falvastagságú hálóval választottuk el.

#### 3.2 In vitro növény regeneráció

A transzgénikus árpa növények Kis et al. 2015 és 2019 alapján lettek előállítva. A kotranszformációhoz Kis et al. 2015 polycisztronikus amiRNS konstrukciója (VirusBuster171) és Kis et al. 2019-es konstrukciójának módosított változata lett felhasználva, melyben csak az sg2-es CRISPR/Cas9 guide RNS lett a konstrukcióba helyezve (13. ábra). A kotranszformáns árpa növények (T<sub>0</sub> generáció) példányairól magokat izoláltunk, majd sterilizáltuk őket. A sterilizáláshoz először 70%-os etil alkoholba helyeztük a magokat 1-2 percre, majd 50%-os kereskedelembe használt hypo oldatban 25 percig 200 rpm-en ráztattuk. Ezt követően a magokat háromszor steril vízzel átmostuk. Minden mag egy körülbelül 1,5-2 mm átmérőjű embriót tartalmazott. Az éretlen embriókat szike segítségével mikroszkóp alatt izoláltuk. Az izolálás során a magot csipesszel fogtuk és az embriogén axist szikével levágtuk. Ezt követően a szkutellumokat 50 mg/l hygromicint tartalmazó CI-50 szelekciós táptalajra (2. sz. melléklet) helyeztük. A szelekciós táptalajon 6 hét alatt kalluszok fejlődtek. A kalluszok alatt a táptalajt 2 hetente cseréltük és a plateket 23 °C-on inkubáltuk. A hygromicines táptalajon növekedő kalluszokat mikroszkóp alatt 550 nm-en vizsgáltuk a kotranszformáns kalluszok elkülönítése céljából. Kiválasztottuk azokat a kalluszokat, amelyeken rózsaszín elszíneződést tapasztaltunk (dsRED expresszió) (10. ábra).



**10. ábra: Kallusz tenyészet.** A kalluszok rózsaszín elszíneződését a dsRED expressziója okozza. (a szerző fotója)

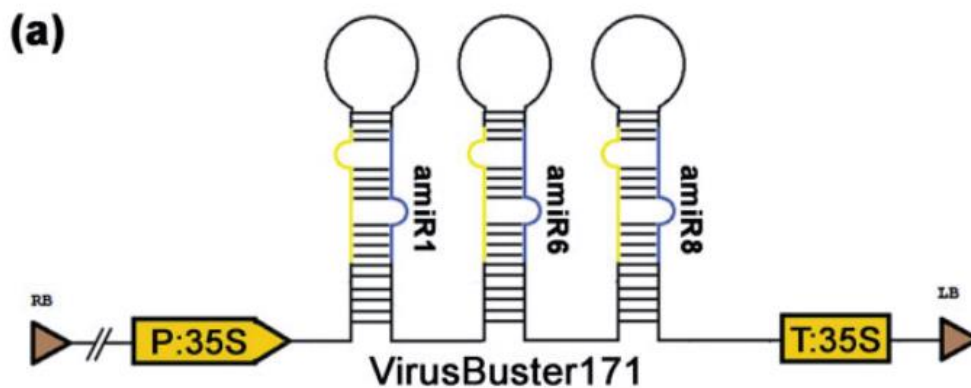
Ahhoz, hogy a kalluszokból növények fejlődjenek a kalluszokat áthelyeztük TR-50 táptalajra, majd ezen növesztettük őket 3 hétig úgy, hogy napi 16 órán keresztül megvilágítást kaptak. A kalluszokból fejlődő növényeket a 2-3 mm-es magasság elérése után regenerációs táptalajra (RG-0) tettük (2. sz. melléklet). Néhány hét elteltével, amikor elérték az 5-7 cm-es magasságot a növényeket először Jiffy tápkockákba, majd cserépbe ültettük szét.

### 3.3 Molekuláris munkák

#### 3.3.1 Vektor konstrukciók

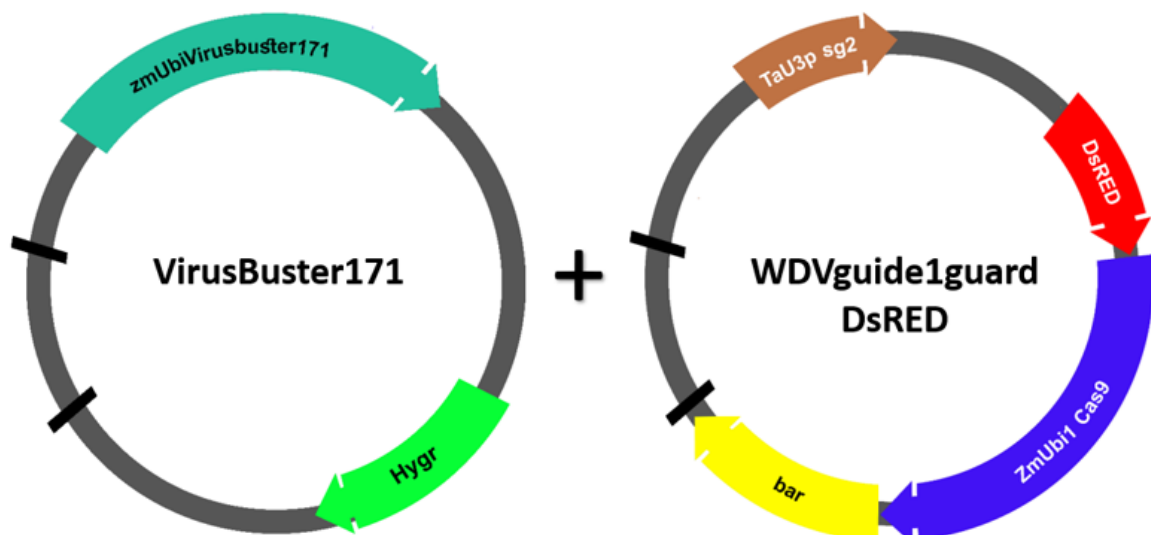
Az árpa növények WDV fertőzésére a pPZP201WDV1,5MER konstrukciót használtuk (Kis et al. 2015). A fertőző konstrukció egy 1,5-szeres WDV genomot tartalmazó bináris vektor, pPZP201 szülővektorban előállítva.

Az árpa transzformációhoz két vektor konstrukció került felhasználásra, egy WDV specifikus policisztronikus amiRNS konstrukció és egy WDV specifikus CRISPR/Cas9 guide RNS-t tartalmazó konstrukció. A WDV specifikus policisztronikus amiRNS konstrukció Kis et al. 2015 cikkben leírtak szerint lett felhasználva. A VirusBuster171 elnevezésű konstrukció három darab WDV-re specifikus amiRNS-t tartalmaz (amiR1, amiR6, amiR8). Ezen felül a konstrukció tartalmaz egy hygromicin rezisztencia gént is, amely segíti a sikeresen transzformált növények kiválasztását (12. és 13. ábra).



11. ábra: A VirusBuster171 elnevezésű policisztronikus amiRNS konstrukció sematikus ábrája (Kis et al 2015).

A Kis et al. 2019-es cikk CRISPR/Cas9 rendszer konstrukciója módosítva került a csoport által készített kotranszformáns növényekbe. Az eredetileg négy darab CRISPR/Cas9 guide RNS-t tartalmazó konstrukcióból végül csak az sg2-es CRISPR/Cas9 guide RNS került az általunk használt konstrukcióba (13. ábra). A konstrukció tartalmaz egy dsRED riportergént is, amely kifejeződése segít detektálni a sikeres transzformációt.



12. ábra: A WDV-specifikus amiRNS-eket és a WDV-specifikus CRISPR rendszert tartalmazó bináris vektorok sematikus ábrája

### 3.3.2 DNS kivonás és PCR

Árpa növényekből DNS kivonást végeztünk és minden alkalommal direkt DNS kivonás technikát alkalmaztunk. Minden egyes 1,5 ml-es Eppendorf csőbe 3 mm-es csapágygolyót tettünk. Ezután a csőbe ~5-10 mg növényi szövetet helyeztünk, majd erre 50 µl Extraction Solution oldatot (Sigma-Aldrich, USA) pipettáztunk. Az Eppendorf csövek tartalmát ezután BeadBeater-96 (BioSpec, USA) készülék segítségével homogenizáltuk 8-as fokozaton, 1 percen keresztül. Ezután a csöveket 95 °C-os termosztátba helyeztük 12 percre, majd 1 percre jégre tettük a csöveket. Miután a minta visszahűlt 50 µl Dilution Solution (Sigma-Aldrich, USA) oldatot adtunk hozzá és vortex készülékkel homogenizáltuk. A homogenizátumot 1 percen keresztül 14000 rpm-en centrifugáltuk, majd a tiszta felülúszót új Eppendorf csövekbe pipettáztuk. Az kivont DNS mintákat ezután -20 °C-on tároltuk.

A WDV genom kimutatásához a PCR reakció végtérfogata 20 µl volt, amelybe 1 µl direkt genomi DNS, 4 µl 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific, USA) reagens, 0.5-0.5 µM forward és reverz primer (WDV\_DET2\_FW: 5' - CGC CTT GGA CTC TCT TCG CAC – 3', WDV\_DET2\_RV1: 5' - GAC GGA TAG ACC ATT CAA ACG – 3'), 4 µM dNTP (Thermo Scientific, USA) keverék, 0.4 U Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) enzim és víz került. A PCR reakciók programját a következőképpen állítottuk be: 98 °C, 3 perc; [98 °C, 10 s; 65 °C, 15 s; 72 °C, 10 s] x 32 ciklus; 72 °C, 10 perc; majd 4 °C-on tartás a minta kivételéig. A várható PCR fragmentum 413 bp hosszú.

A Cas9 expresszióját RT PCR-rel ellenőriztük. Az expresszált RNS-ről cDNS-t készítettünk majd PCR reakcióval vizsgáltuk. A 20 µl-es reakcióelegybe 1 µl cDNS-t, 4 µl 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific, USA) reagenst, 0.5-0.5 µM forward és reverz primert (zCas9\_det\_FW: 5' - GCC TAC CAC GAG AAG TAC CCT AC – 3', zCas9\_det\_RV: 5' - GGT CAT CGT CGT ATG TGT CCT TG – 3'), 4 µM dNTP (Thermo Scientific, USA) keveréket, 0.4 U Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) enzimet és vizet tettünk. A PCR program beállításai: 98 °C, 3 perc; [98 °C, 10 s; 63 °C, 15 s; 72 °C, 10 s] x 32 ciklus; 72 °C, 10 perc; majd 4 °C-on tartás a minta kivételéig. Az általunk várt PCR fragmentum hossza 445 bp.

Az sg2 guide RNS-ről cDNS-t készítettünk, majd PCR-rel vizsgáltuk. A 20 µl-es reakcióelegybe 1 µl cDNS, 4 µl 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific, USA) reagens, 0.5-0.5 µM forward és reverz primer (guideRNA\_det\_RV: 5' - GCA CCG ACT CGG TGC

CAC TTT TTC – 3', WDV\_sg2\_FW: 5' - GGC GTG GAA TAG ACA CGG AAC CT - 3' ), 4  $\mu$ M dNTP (Thermo Scientific, USA) keverék, 0.4 U Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) enzim és víz került. A PCR program beállításai: 98 °C, 3 perc; [98 °C, 10 s; 68 °C, 15 s; 72 °C, 8 s] x 32 ciklus; 72 °C, 10 perc; majd 4 °C-on tartás a minta kivételéig. A várható PCR végtermék hossza 96 bp.

### **3.3.3 DNS elektroforézis és DNS visszaizolálás gélből**

A DNS fragmentumok és plazmidok jelenlétét és méretét gélelektroforézissel ellenőriztük. Az 1,2%-os agaróz gél 1x-es TBE puffer (3. sz. melléklet) felhasználásával készítettünk el és megolvasztottuk. A DNS fragmentumok későbbi láthatóvá tétele érdekében a keverékhez etídium-bromidot adtunk. Az elkészült folyékony halmazállapotú gél üveglapra öntöttük és fésűt helyeztünk bele. Miután a gél szilárd halmazállapotú lett a 'fésűt' eltávolítottuk és a gél futtató kádba helyeztük, amely 1x-es TBE pufferrel volt feltöltve. A mintákhoz 6x Loading Dye (Thermo Fisher, USA) festéket kevertünk, amely a zsebekben tartja a mintákat és segítségével látjuk a futás állapotát. A DNS darabok méretének beazonosítására GeneRuler 100 bp plus (Thermo Fisher, USA) DNS 'létrát' alkalmaztunk. Az eredmény vizualizálásához ChemiDoc™ Imaging System (Biorad, USA) készüléket használtunk.

A DNS fragmentumok visszaizolálását GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher, USA) használatával végeztük a gyártó előírása szerint. A fragmentumokat a Eurofins Mix2Seq kit segítségével szekvenáltuk meg.

### **3.3.4 RNS izolálás és cDNS előállítás**

Totál RNS kivonást az árpa növényekből TRI® Reagent RNA Isolation (Sigma-Aldrich, USA) oldat felhasználásával végeztük, a gyártó protokollja szerint. A növényekből körülbelül 100 mg mintát vettünk (levél rész), majd folyékony nitrogénben homogenizáltuk. Az izolált RNS minőségét spektrofotométerrel teszteltük (NanoDrop 2000).

A RNS-ből cDNS molekulák előállítását RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) felhasználásával végeztük. Minden mintából 1  $\mu$ g RNS-t vettünk, majd Random decamer primer segítségével cDNS-t állítottuk elő a gyártó utasításait követve.

### **3.3.5 Kis RNS northern hibridizáció**

A kis RNS-eket northern hibridizációval detektáltuk. A northern hibridizáció segítségével lehetőség van az RNS molekulák méretének és mennyiségének meghatározására és az expressziós mintázatok elemzésére. A mintából 6  $\mu$ g totál RNS-t vettünk, majd 1:1 arányú FDE festékkel denaturáltuk (15 perc, 65 °C). Az RNS-eket ezután 12 %-os urea tartalmú

poliakrilamid gélen választottuk el. A kisRNS-eket tartalmazó poliakrilamid gél részletet Hybond-NX nylon membránra vittük át semi-dry blot módszerrel. A géldarabot és a membránt 3-3 db 1X TBE pufferben megnedvesített szűrőpapír közé helyeztük, majd 7-10 V feszültséggel 1 órán át blottoltuk. Ezt követően a kis RNS-eket kémiai keresztkötésekkel fixáltuk a membránra. Ehhez 10 ml végtérfogatba 122,5 µl metil-imidazolt, 10 µl tömény sósavat és 0,373 g EDC-t mértünk be. Az oldattal átitattunk egy szűrőpapírt, amely a membrán méretével megegyező nagyságú volt. Ezután a szűrőpapírra helyeztük a membránt az RNS-t tartalmazó oldalával felfelé, frissentartó fóliába csomagoltuk és 1 órán keresztül 60 °C-on inkubáltuk. Inkubálás után a membránt desztillált vízzel rázatás mellett átmostuk. A membránt ezután hibridizáltuk az adott kisRNS-re specifikus próbával (amiR1\_det: 5'- CAG GTT CCG TGT CTA TTC CAA-3'). A membránt a hibridizáció előtt 20 percig 2 X SSC-vel, a hibridizáció hőmérsékletén 1 órán keresztül a hibridizáláshoz használt oldattal inkubáltuk. Ezt követően a 10 ml friss kisRNS hibridizáló pufferhez 1 µl próbát pipettáztunk, majd a hibridizáló kamrában 50 °C-on, egy éjszakán keresztül, folyamatos forgatás mellett inkubáltuk. Másnap kétszer 10 percig átmostuk 2X SSC-t és 0,1 % SDS-t tartalmazó 50 °C-os előmelegített oldattal. Ezután a biotinnal jelölt próba detektálását a Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Kit (Thermo Fischer Scientific) segítségével végeztük, a gyártó protokollját követve. A kemilumineszcens jelet a Biorad ChemiDoc dokumentációs rendszer ImageLab programjának Chemi high resolution alkalmazásával rögzítettük.

### **3.4 Agrobaktérium közvetített WDV fertőzés**

Az agroinokulációt megelőzően körülbelül 100 db vad típusú Golden Promise árpa magot steril vízben áztattunk egy éjszakán keresztül. A steril vízbe acetosziringont tettünk, amely növeli a transzformáció hatékonyságát. A transzformációhoz szükséges pPZP201WDV1,5MER konstrukciót tartalmazó agrobaktérium AGL-1 törzset kanamicint és rifampicint tartalmazó szilárd YEB táptalajon (3. sz. melléklet) növesztettünk két napon keresztül. A beáztatott, megduzzadt magokat az embrió felőli (háti oldal) oldalával belemártottuk az agrobaktériumba, majd egy steril 30G méretű tűvel 3-5 helyen megszúrtuk az embrió helyén. A magokat ezután egy nagyobb Petri-csészébe tettük, amelybe előzetesen egy szűrőpapírt vágunk és benedvesítettünk. A magokat 3 napig 23 °C-on inkubáltuk, majd földbe vetettük. A fertőzött növényeket négy hét után vizsgáltuk PCR-rel, hogy kimutatható-e a WDV fertőzés jelenléte. Az ilyen módon sikeresen előállított fertőzött árpa növények egy általunk ismert genomszekvenciával rendelkező vírust tartalmaznak.

### 3.5 Kabóca vektorral közvetített WDV fertőzés

Az agroinokulációval létrehozott WDV fertőzött növényekre henger alakú hálós mikroizolátorokat (3,5 cm x 3 cm) tettünk és két végét szivacs korongokkal zártuk le úgy, hogy a levél ne sérüljön (13. ábra). Minden növényre 2 izolátort helyeztünk és fapálcikákkal rögzítettük. Egy mikroizolátorba 3 kabócát tettünk és 7 napig hagytuk a WDV fertőzött növényeken. Ezt követően a kabócákat áthelyeztük a transzgénikus növényeinkre és szintén 7 napig hagytuk táplálkozni őket.

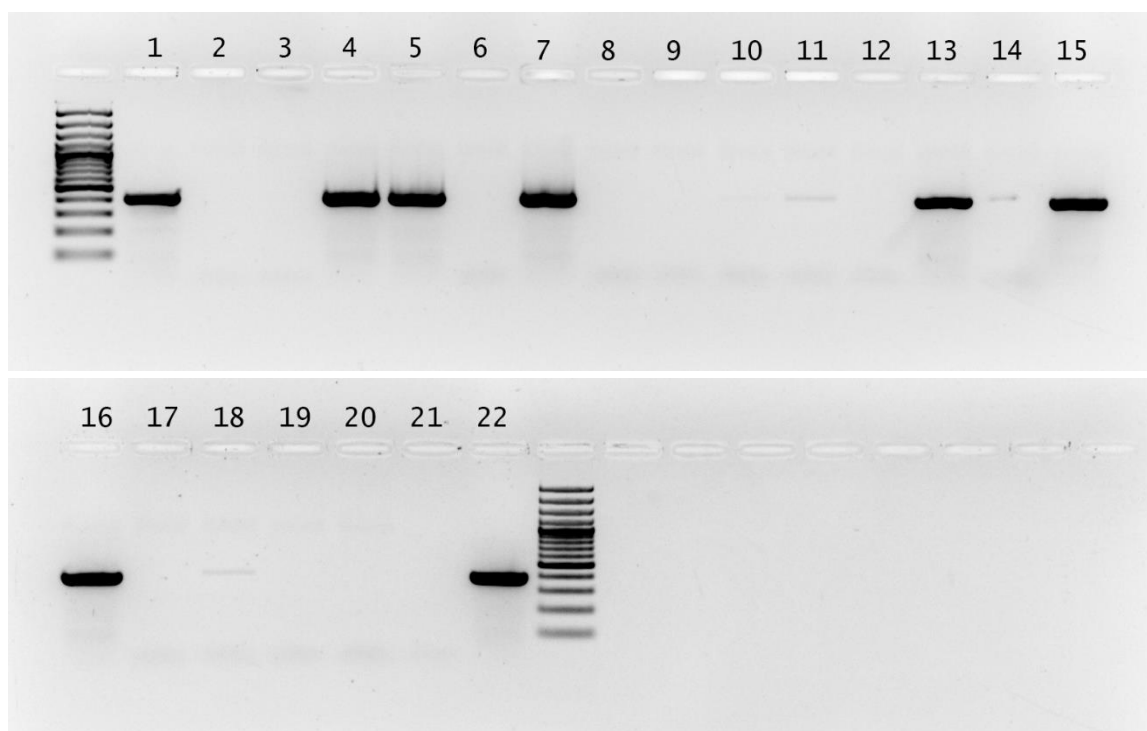


**13. ábra: Kabóca vektorral közvetített WDV fertőzéshez használt mikroizolátor (Kis 2018)**

## 4. Eredmények és értékelésük

### 4.1 WDV fertőzött növények létrehozása agroinokulációval

Az agroinokulációval fertőzött árpa növények esetében a növények egy ismert genomszekvenciával rendelkező WDV vírus törzset tartalmaznak. Ezzel szemben amennyiben a természetből begyűjtött csíkos gabonakabóccákkal fertőztünk volna, úgy a növényeink valószínűleg több WDV törzsszel fertőződtek volna meg, ami a későbbiekben a vírusok detektálását megnehezítette volna. A mesterséges vírusfertőzést pPZP201WDV1,5MER konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium*-mal hajtottuk végre. Összesen 100 magot fertőztünk és ültettünk el, ebből 19 kelt ki. Fertőzés után öt héttel a növények egy része WDV fertőzésre utaló tüneteket mutatott. Az összes kikelt növényből mintát vettünk (levél rész), majd PCR analízist végeztünk (14. ábra).



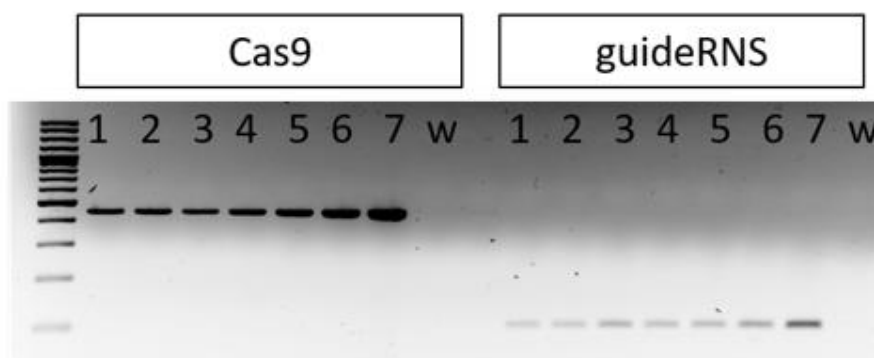
**14. ábra: WDV DNS kimutatása PCR-rel az agroinokulációval fertőzött árpa növényekből; 1-19: fertőzött növények; 20: nem fertőzött árpa növény 21: desztillált víz, mint negatív kontroll; 22: pPZP201WDV plazmid, mint pozitív kontroll.**

A WDV DNS jelenlétét 10 növény esetében sikerült kimutatnunk.

## 4.2 Kotranszformáns T<sub>1</sub> árpa növény klónok molekuláris vizsgálata

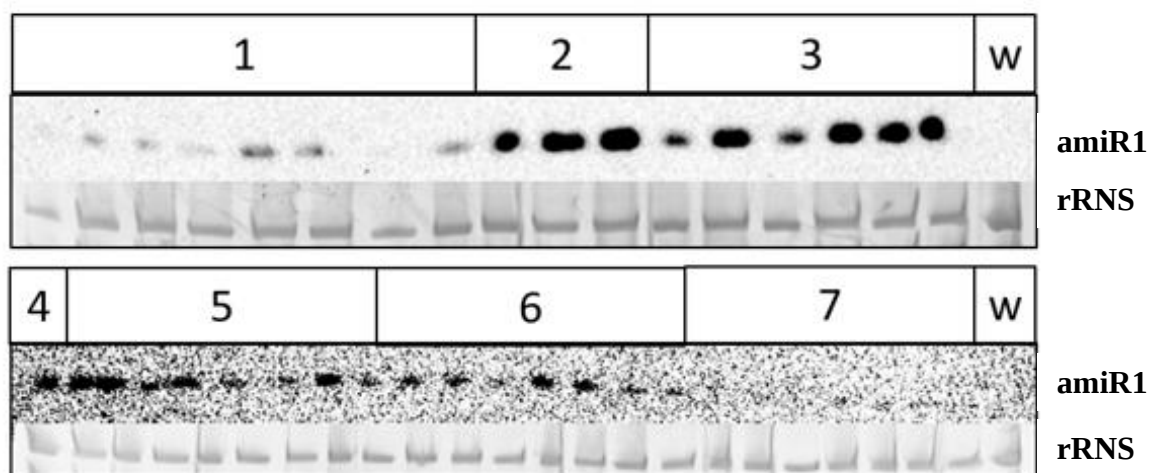
A Növényi Fejlődésbiológiai Csoport kotranszformáns árpa növényeket hozott létre a 13. ábrán szemléltetett vektorkonstrukciókkal. A T<sub>0</sub> generációs kotranszformáns növények egyedeiből izolált embriókból *in vitro* kalluszkultúrákat állítottunk elő. A célunk az volt, hogy a hasadó T<sub>1</sub> generációban nagy számú, genetikailag azonos kotranszformáns növényt hozzunk létre. Ennek okán a hygromicint tartalmazó (polycisztonikus amiRNS konstrukció) táptalajon fejlődött kalluszkultúrák közül 7 darab olyat választottunk ki, amelyek dsRED-et expresszáltak (CRISPR/Cas9 konstrukció). A 7 kalluszból összesen 40 növényt választottunk ki. A regenerált növényeken megvizsgáltuk a transzgének expresszióját RT PCR-rel és kis RNS northern hibridizációval.

A kiválasztott növényekben a CRISPR/Cas9 sg2 konstrukció sikeres beépülését és expresszióját RT PCR segítségével mutattuk ki. Ezen molekuláris analízissel mind a 7 vonalban sikeresen kimutattuk a Cas9 és a guide RNS szekvenciák expresszióját (15. ábra).



**15. ábra: Cas9 és guide RNS RT PCR; 1-7: a 7 különböző kalluszból kiválasztott 1-1 növény; w: 'wild type', vad genotípus, mint negatív kontroll**

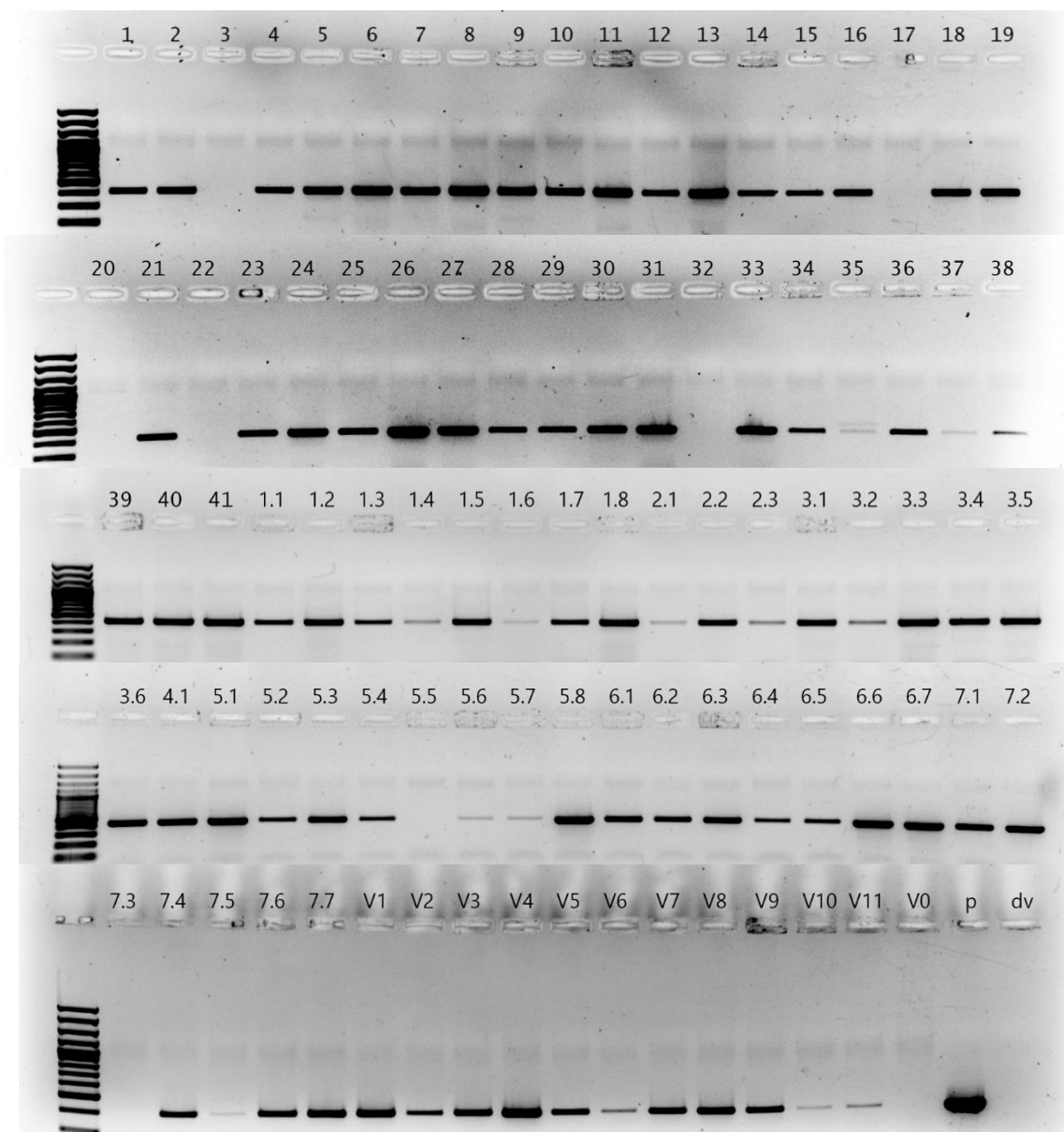
A policisztronikus amiRNS konstrukció beépülését és az amiRNS-ek termelődését kis RNS northern hibridizációval ellenőriztük. A transzformációs kazettánk három amiRNS-t tartalmazott (amiR1, amiR6, amiR8), amelyből az amiR1 kifejeződését vizsgáltuk. A WDV amiR1 kis RNS expressziója mind a 40 vizsgált kotranszformáns növény esetében kimutatható volt (16. ábra). A különböző kalluszekről izolált növények amiRNS expressziójának mértékében volt különbség, amely a beépült transzgén kópiaszám különbségeknél tudható be.



**16. ábra: A 40 izolált növény WDV amiR1 kis RNS northern hibridizációja**

#### **4.3 Kotranszformáns vonalak WDV fertőzésének eredménye**

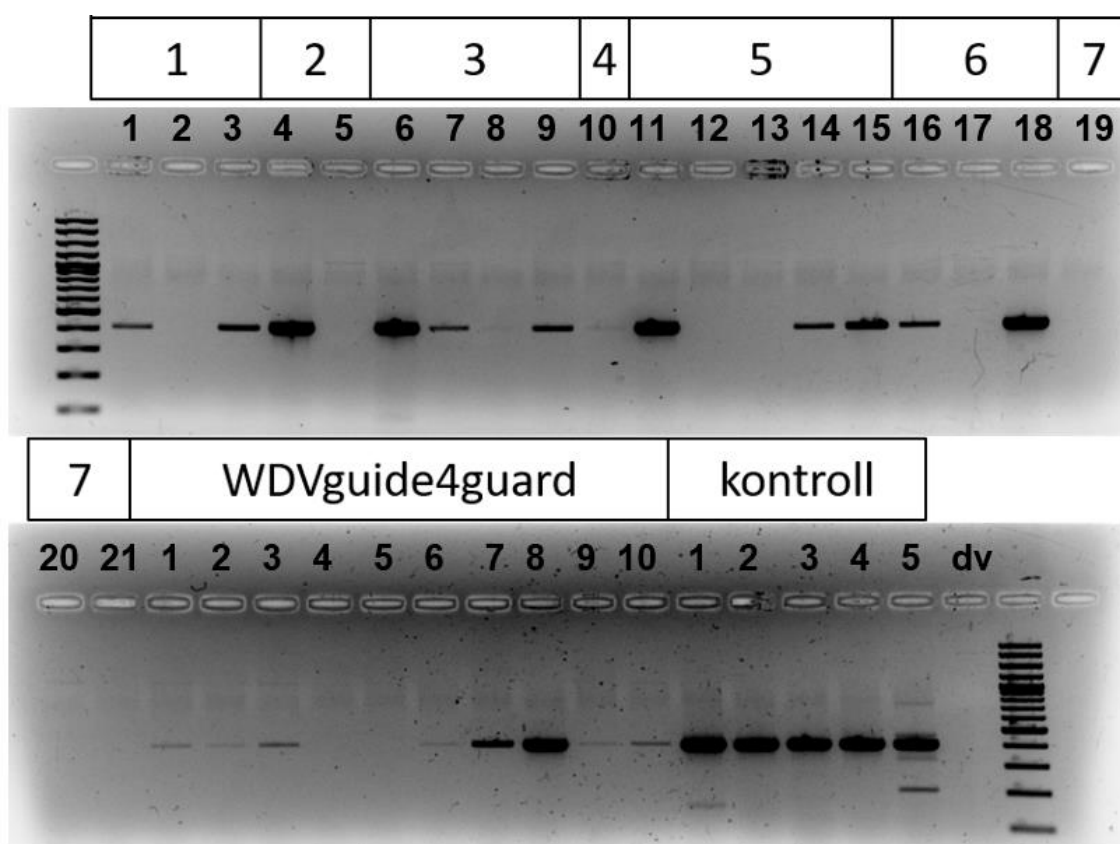
Az agrobaktérium segítségével létrehozott WDV fertőzött árpa növényekre kabócákat helyeztünk, majd 1 hét után áttettük őket az egészséges kotranszformáns növényekre. Összesen 40 db kotranszformáns (mindkét konstrukciót tartalmazó), és kontrollként 40 db korábbi négy guide RNS-es konstrukciót tartalmazó (Kis et al 2019) vonalat és 11 db nem transzformáns kontroll árpa növényt fertőztünk meg rovarvektorral. A fertőzés után 7 nappal a megfertőzött növényeken molekuláris analízist végeztünk, hogy kimutatható-e a vírus a levelekben. A mikroizolátorok helyéről vett levél mintákból PCR-rel mutattuk ki a WDV DNS jelenlétét.



**17. ábra: A transzformáns növények WDV fertőzöttségének ellenőrzése PCR-rel a fertőzés után 7 nappal; 1-41: korábbi négy guide RNS-es konstrukciót tartalmazó növények; 1.1-7.7: kotranszformáns növények; V1-11: fertőzött vad típusú növények, V0: nem fertőzött vad típusú növény, p: pPZP201WDV plazmid, mint pozitív kontroll; dv: desztillált víz, mint negatív kontroll.**

A növények többségénél ki tudtuk mutatni a fertőzést, ami azt jelenti, hogy a rovarvektoros fertőzés sikeres volt. Összesen 95 esetben tudtuk kimutatni PCR-rel a WDV jelenlétét (17. ábra).

A fertőzött növényekből legközelebb a kalászosítás időpontjában vettünk mintát. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a beépített konstrukciók milyen hatással vannak a WDV fertőzés kimenetelére. Időközben sajnos a nem megfelelő nevelési körülményeknek köszönhetően a növények egy része a vegetációs időszak közepén elpusztult. A növénynevelő kamrában tönkre ment a légkondicionáló berendezés, így a növények egy erős hőstressznek voltak kitéve, amit a világító rendszer folyamatos működése idézett elő. Valószínűleg az egészségesebb, nagyobb levélfelülettel rendelkező növények pusztultak el, mivel a nagyobb levélfelület intenzívebb transpirációt eredményez. Összesen 36 darab növény maradt életben, amelyeken a molekuláris analízist el tudtuk végezni.



**18. ábra: WDV fertőzött transzgénikus növények PCR analízise a kalászosítás időpontjában; 1-21: a 7 különböző kallusztól regenerált kotranszformáns növények; WDVguide4guard 1-10: a 4 guide RNS-es konstrukciót tartalmazó transzgénikus növények; kontroll 1-5: fertőzött vad típusú növények; dv: desztillált víz.**

A kalászosítás időpontjában vett mintákat WDV replikáz gén specifikus PCR analízis alá vetettük. Habár a minták számának csökkenése torzíthatja az eredményeket, azt vártuk, hogy a kotranszformáns növényekben a WDV DNS szint alacsonyabb lesz a kettős

védekezésnek (CRISPR/Cas9 és amiRNS) köszönhetően, mint a korábbi 4 guideRNS-t tartalmazó transzgénikus növényeknél. Összesen 21 db kotranszformáns növényt vizsgáltunk, amelyek közül 11 növényben volt kimutatható a fertőzés. A korábbi négy guide RNS-t tartalmazó CRISPR/Cas9-cel transzformált növények közül 10-ből 8-nál mutattuk ki a WDV genom jelenlétét. A vad típusú kontroll növények esetében 5-ből 5-nél kimutatható volt a fertőzés (18. ábra).

|                              | <b>Fertőzött</b> | <b>Egészséges</b> | <b>Fertőzött %</b> | <b>Rezisztens %</b> |
|------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Kotranszformáns növények     | 11               | 10                | 52 %               | 48 %                |
| WDVguide4guard (4 guide RNS) | 8                | 2                 | 80 %               | 20 %                |
| Kontroll vad típusú növények | 5                | 0                 | 100 %              | 0 %                 |

**1. táblázat: Egészséges és WDV fertőzött növények eloszlása.**

Eredményeink igazolták hipotézisünket, miszerint a CRISPR/Cas9 sg2 konstrukció és a policisztronikus amiRNS konstrukció együttes alkalmazásával hatékonyabb rezisztencia érhető el a WDV vírussal szemben. A transzgénikus vonalakban összességében kevesebb WDV fertőzött növényrel találkoztunk, illetve a fertőzés mértéke is mérsékeltebb volt. A legjobb rezisztenciát azok az árpa növények mutatták, melyekben az sg2 guide RNS és a policisztronikus amiRNS is expresszáldott. Itt a növények 52%-ban lehetett kimutatni a WDV genom jelenlétét, míg a növények 48%-as rezisztensnek bizonyult. Azok a növények, amelyek négy guide RNS-t expresszáltak szintén mutattak némi rezisztenciát, ugyanis itt a növények 80%-a lett beteg és 20%-a egészséges maradt. A nem transzgénikus kontroll növények mindegyikében ki lehetett mutatni PCR-rel a WDV jelenlétét. Feltételezzük, hogy a nagyobb és egészségesebb növények pusztultak el. Amennyiben ez nem történt volna meg, úgy valószínűleg több rezisztens egészséges növény került volna a statisztikánkba.

A vírusfertőzött növényekből WDV DNS-t izoláltunk azzal a céllal, hogy megnézzük történt-e mutáció a Cas9 hasítási helye körül. Kis és munkatársai 2019-es cikkükben arról számoltak be, hogy kizárólag az sg2 guide RNS helyén találtak mutációt és vad típusú vírus genomot nem azonosítottak a fertőzött növények között. Ebből arra következtettek, hogy a 4 guide RNS közül valószínűleg csak az sg2 működik, hiszen a többi guide RNS helyén DNS hibajavítás nem történt.



**19. ábra: Kotranszformáns fertőzött növényekből izolált WDV szekvenálása**

Szekvenálási eredményeink szerint 11-ből csak 1 esetben történt mutáció az sg2-es guide RNS célszekvenciájában. Ez megcáfolja Kis et al 2019-es cikke szerinti következtetést, hiszen nem minden hasítás helyén keletkezett mutáció (19. ábra).

## 5. Következtetések és javaslatok

Lehetséges olyan transzgénikus árpa növényeket létrehozni, amelyek ellenállóak a vírusokkal szemben. Ehhez olyan konstrukciókat kell sikeresen beépítenünk a növény genomjába, amelyek képesek különböző mechanizmusokon keresztül elpusztítani a vírusokat vagy megakadályozni a vírusok szaporodását a növényben. Ilyen konstrukció lehet például egy mesterséges miRNS-eket tartalmazó policisztronikus amiRNS konstrukció vagy egy guide RNS-t tartalmazó CRISPR/Cas9 konstrukció.

Árpa növények esetében mesterséges WDV vírusfertőzést agroinokulációval sikeresen lehet kivitelezni. A másfélszeres WDV genomot tartalmazó pPZP201WDV1,5MER konstrukció lehetővé teszi azt, hogy egy cirkuláris WDV genom jöjjön létre a gazdasejtben. Ez az agrobaktériummal történő fertőzési technika lehetővé tette azt, hogy a továbbiakban általunk ismert WDV törzzsel dolgozzunk.

Kísérleteinkben igazoltuk azt, hogy a Növényi Fejlődésbiológia Csoport által létrehozott kotranszformáns növényekbe a policisztronikus amiRNS konstrukció sikeresen beépült. Kis RNS northern hibridizációval igazoltuk az amiR1 kifejeződését. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a policisztronikus konstrukcióban megtalálható mind a három (amiR1, amiR6, amiR8) amiRNS valószínűleg expresszálódik és hatékonyan működik a védekezésben. RTPCR technikával kimutattuk, hogy a CRISPR/Cas9 sg2 konstrukció is sikeresen beépült és expresszálódik. Az amiRNS-ek, a Cas9 és a gRNS kifejeződése még nem vetíti elő a rezisztenciát, hiszen hatékonyságukat vírusfertőzés hatására is tesztelni kell.

A kotranszformáns, amiRNS-eket és sg2 gRNS-t expresszáló növényeket kabóca vektorral megfertőztük és 7 nap elteltével mintát vettünk a levélből onnan, ahová korábban kabócákat helyeztük. A WDV DNS jelenléte szinte minden mintánkban megtalálható volt, amiből arra következtethetünk, hogy a módszer kiválóan alkalmas WDV átvitelre.

A fertőzött kotranszformáns növényeket kalászosítás időpontjában vizsgáltuk újra, hogy milyen rezisztenciát tanúsítanak a WDV-vel szemben. Időközben a növényeink egy része elpusztult, így megfelelő statisztikát és konzekvenciát nem tudunk levonni az eredményekből. Ettől függetlenül a végeredményből egyértelműen kiderül, hogy a transzformáns és kotranszformáns növények nagyobb ellenállást mutatnak WDV-vel szemben, mint a kontroll nem transzformáns növények. Ebből arra lehet következtetni, hogy ha „több fronton” támadjuk a vírust, genomjának több részletét vesszük célba, akkor nagyobb rezisztencia

érhető el. A szekvenálási eredmények azt mutatják, hogy Kis et al. 2019 szerint alkalmazott 4 guide RNS-t tartalmazó rendszer használatakor feltehetőleg nem csak egy guide RNS működött. A mostani eredmények szerint nem kizárható, hogy korábban a többi guide RNS is képes volt DNS hasítást indukálni, csak nem következett be hibajavítás és mutáció. Feltételezzük, hogy az sg2-es guide valóban a leghatékonyabb guide RNS, de egy IN-FRAME mutáció következtében, ha a vírus ki tudott lépni az sg2-es guide RNS általi rezisztencia alól, a többi guide RNS már nem tudta megakadályozni a vírus szisztemizálódását. Jelen esetben, egyedül az sg2 guide RNS sem volt képes erre, ezért önmagában a vad típusú vírus genom is képes volt hatékonyan elterjedni a növényben, az amiRNS-ek jelenlétének ellenére is. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy a CRISPR/Cas9 alapú rezisztencia WDV-vel szemben valószínűleg elsődlegesen nem a mutációk kialakulásán, hanem a DNS genomok elvágásán alapszik.

A három amiRNS-t tartalmazó policisztronikus amiRNS konstrukció és 1 db guide RNS-t tartalmazó CRISPR/Cas9 konstrukció alkalmazásával nem tudunk teljes rezisztenciát elérni. A felhasznált vektorrendszer hatékony, viszont a hatékonyságot új gRNS-ek használatával bizonyára fokozni lehet. Sajnos abból sem tudunk levonni következtetéseket, hogy a CRISPR/Cas9 rendszer mellett az amiRNS-ek alkalmazása milyen mértékben befolyásolhatta a rezisztenciát, hiszen a transzgénikus kontroll növények nem csak az sg2-es guide RNS-t tartalmazták, hanem mellette még kettő expresszálo guide RNS-t. A jelen eredmények fényében mind a három guide RNS funkcióképes lehetett, ezért a két csoport nem összevethető e tekintetben.

## 6. Összefoglalás

Az olyan transzgénikus növények, amelyek ellenállóak a vírusokkal szemben, fontosak lehetnek a mezőgazdasági termelésben és az élelmiszeriparban, mivel javíthatják a növénytermesztés hatékonyságát, növelhetik a terméshozamot és csökkenthetik a növényvédő szerek használatát. Kutatásunkban egy olyan transzgénikus árpa növény létrehozását tűztük ki célul, amely hatékonyan tud védekezni a búza törpülés vírus (WDV) ellen.

Munkánk alapja Kis et al. 2015 és Kis et al. 2019 publikációi voltak, amelyekben különböző módszerekkel hoztak létre WDV rezisztens árpa növényeket. A 2015-ös cikkben arról számoltak be, hogy policisztronikus mesterséges miRNS-ket felhasználásával alacsony hőmérsékleten is tudják célzottan gátolni a WDV genom működését. Kis és munkatársai 2019-es tanulmánya azt mutatta, hogy a CRISPR/Cas9 rendszerrel a növényekben nagyon hatékony rezisztenciát lehet kialakítani vírusos betegségekkel szemben akkor, ha a megfelelő guide RNS-eket alkalmazzuk. Ugyanakkor azt is megállapították, hogy CRISPR/Cas9 rendszer működésének hatására mutáns WDV genomok keletkezhetnek. Kísérleteinkben azt szerettük volna megvizsgálni, hogy a két rendszert kombinálva milyen fokú rezisztencia érhető el és hogy a mutáns WDV genomok ellen képesek-e védelmet biztosítani az amiRNS-ek.

Munkánk során először agrobaktérium segítségével hoztunk létre mesterségesen WDV fertőzött árpa növényeket. A későbbiekben ezeket a növényeket használtuk fel arra, hogy rovar vektor segítségével WDV átvitelt végezzünk a teszt növényeinkre. A Növényi Fejlődésbiológiai Csoport olyan kotranszformáns növényeket hozott létre, amelyek a policisztronikus amiRNS konstrukciót hygromicin szelekciós génnel és a CRISPR/Cas9 guide RNS konstrukciót dsRED riportergénnel tartalmaztak. A T<sub>0</sub> generáció magjaiból embriókat preparáltunk és hygromicin tartalmú szelekciós táptalajon kalluszt növesztettünk, majd dsRED expressziót vizsgálva válogattuk ki a kotranszformáns növényeket. A kiválasztott kalluszokról regenerált növényekben az amiRNS-ek, a Cas9 és a guide RNS expresszióját sikeresen kimutattuk. A kotranszformáns növényeket ezután rovarvektor által WDV-vel fertőztük meg és a kalászolás időpontjában vizsgáltuk a rezisztenciát.

Az eredmények azt mutatják, hogy bár a teljes rezisztencia elérése két konstrukció szimultán alkalmazásával nem sikerült, azonban a kotranszformáció magas fokú rezisztenciát eredményezett. A kotranszformáns növények közel 50%-a vírusmentesnek bizonyult, amely fontos előrelépés lehet a kórokozóval szembeni hatékonyabb védekezés szempontjából. Az

eredmények további kutatásokra adnak okot, hogy új CRISPR/Cas9 guide RNS-ek és mesterséges miRNS-ek együttes alkalmazásával hatékonyabb rezisztenciát érhetünk el.

## **7. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetet szeretnék mondani minden olyan személynek, aki hozzájárult a diplomadolgozatom elkészültéhez. Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Kis Andrásnak tartozom köszönettel amiért elvállalta témavezetésemet és lehetővé tette, hogy részt vegyek kutatásukban. Köszönöm, hogy mindig végtelen türelemmel fordult hozzám, hogy folyamatosan támogatott, illetve, hogy szaktudása és szakmai tapasztalatai megosztásával hatalmas segítséget nyújtott munkám során.

Köszönettel tartozom továbbá a Növényi Fejlődésbiológiai Csoport többi tagjának is, Dr. Havelda Zoltán csoportvezetőnek, Dr. Dalmadi Ágnesnek és Poldán Erzsébetnek a laborban nyújtott szakmai segítségért.

Köszönöm az ATK Növényvédelmi Intézet munkatársainak, különösképpen Tholt Gergelynek a kabócás fertőzés során nyújtott segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani a családomnak és barátaimnak is, akik mindvégig mellettem álltak és biztattak. Külön köszönöm férjemnek, hogy egyetemi éveim során végtelen kitartással és szeretettel támogatta céljaim elérését.

## 8. Irodalomjegyzék

- ABDALLAH, N. A., PRAKASH, C. S., MCHUGHEN, A. G. (2015): Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. In: *GM crops & food* (6), 183–205 p.
- BARTEL, D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* (116), 281–297 p.
- BARTLETT, J.G., ALVES, S.C., SMEDLEY, M., et al. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. In: *Plant methods* (4), 22 p.
- BHOJWANI, S.S. & DANTU, P.K. (2013): Tissue and cell culture. In: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* pp. 39–50. Springer.
- BO, L., WU, J.-J. és FU, D.-L. (2015): Constructing the barley model for genetic transformation in Triticeae. In: *Journal of Integrative Agriculture* (14), 453–468 p.
- BORTESI, L., & FISCHER, R. (2015): The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. In: *Biotechnology advances* (33), 41–52 p.
- CISNEROS, A. E., & CARBONELL, A. (2020): Artificial Small RNA-Based Silencing Tools for Antiviral Resistance in Plants. In: *Plants* (9), 669 p.
- CONSORTIUM, I.B.G.S. (2012): A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. In: *Nature* (491), 711–716 p.
- COSTA, M. C., LEITÃO, A. L., ENGUITA, F. J. (2012): Biogenesis and mechanism of action of small non-coding RNAs: insights from the point of view of structural biology. *International journal of molecular sciences*, (13), 10268–10295 p.
- DAHLEEN, L.S. és MANOHARAN, M. (2007): Recent advances in barley transformation. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* (43), 493–506 p.
- DALE, P., MARKS, M., BROWN, M., et al. (1989): Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos. In: *Plant Science* (63), 237–245 p.
- DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E. (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: *Science* (346), 1258096.
- FAHIM, M., MILLAR, A. A., WOOD, C. C., LARKIN, P. J. (2012): Resistance to Wheat streak mosaic virus generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. In: *Plant biotechnology journal* (10), 150–163 p.
- GELVIN, S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. In: *Microbiology and molecular biology reviews* (67), 16–37 p.
- GHORBANI, A., HADIFAR, S., SALARI, R., IZADPANAH, K., BURMISTRZ, M., AFSHARIFAR, A., ESKANDARI, M. H., NIAZI, A., DENES, C. E., & NEELY, G. G. (2021): A short overview of

- CRISPR-Cas technology and its application in viral disease control. In: Transgenic research (30), 221–238 p.
- GUO, Q., LIU, Q., SMITH, N. A., LIANG, G., WANG, M. B. (2016): RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. In: Current genomics (17), 476–489 p.
- GUTIERREZ, C., RAMIREZ-PARRA, E., CASTELLANO, M.M., et al. (2004): Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. In: Veterinary microbiology (98), 111-119 p.
- HANLEY-BOWDOIN, L., BEJARANO, E.R., ROBERTSON, D., et al. (2013): Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. In: Nature Reviews Microbiology (11), 777-788 p.
- HARWOOD, W.A. (2014): A protocol for high-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. In: Cereal Genomics: Methods and Protocols, 251-260 p.
- HARWOOD, W.A. (2019): An Introduction to Barley: The Crop and the Model. In: Methods in molecular biology, 1900:1-5.
- HESZKY, L.D. (2011) A transzgén és funkciói. Agrofórum II./2., 90-96.
- JOLÁNKAI, M. (2005): Növénytermesztés tan 1 - Gabonafélék: Mezőgazda Kiadó, pp. 202-231.
- KHAN, Z. A., KUMAR, R., & DASGUPTA, I. (2022): CRISPR/Cas-Mediated Resistance against Viruses in Plants. In: International journal of molecular sciences (23), 2303.
- KIS A. (2018): Búza törpülés vírus rezisztencia kialakítása árpaiban mesterséges miRNS felhasználásával. Doktori (PhD) értekezés, SZIE, Gödöllő, 82 p.
- KIS, A., HAMAR, É., THOLT, G., BÁN, R., HAVELDA, Z. (2019): Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. In: Plant biotechnology journal (17), 1004-1006 p.
- KIS, A., THOLT, G., IVANICS, M., VÁRALLYAY, É., JENES, B., HAVELDA, Z. (2016): Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to Wheat dwarf virus in barley is highly efficient at low temperature. In: Molecular plant pathology (17), 427–437 p.
- KVARNHEDEN, A., LINDBLAD, M., LINDSTEN, K., et al. (2002): Genetic diversity of Wheat dwarf virus. In: Archives of virology (147), 205-216 p.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W., TUSCHL, T. (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. In: Science (294), 853–858 p.
- LAM, J. K. W., CHOW, M. Y. T., ZHANG, Y., LEUNG, S. W. S. (2015): siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. In: Molecular Therapy—Nucleic Acids (4), e252
- Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein, and D.P. Bartel. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science. 294:858-862.

- LEE, R. C., & AMBROS, V. (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. In: *Science* (294), 862–864 p.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L., AMBROS, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* (75), 843–854 p.
- LUKINAC, J., JUKIĆ, M. (2022): Barley in the Production of Cereal-Based Products. In: *Plants* (11), 3519 p.
- MAYER, K. F. X., WAUGH, R., BROWN, J. W. S., SCHULMAN, A., LANGRIDGE, P. (2012): A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* (491), 711-716 p.
- MAYER, K. F., TAUDIEN, S., MARTIS, M., SIMKOVÁ, H., SUCHÁNKOVÁ, P., GUNDLACH, H., WICKER, T., PETZOLD, A., FELDER, M., STEUERNAGEL, B., SCHOLZ, U., GRANER, A., PLATZER, M., DOLEZEL, J., STEIN, N. (2009): Gene content and virtual gene order of barley chromosome 1H. In: *Plant Physiology* (151), 496-505 p.
- MUHAMMAD, T., ZHANG, F., ZHANG, Y., LIANG, Y. (2019): RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors. In: *Cells* (8), 38 p.
- ORDON, F., HABEKUSS, A., KASTIRR, U., et al. (2009): Virus Resistance in Cereals: Sources of Resistance, Genetics and Breeding. In: *Journal of Phytopathology* (157), 535-545 p.
- RAMSELL, J.N.E., BOULTON, M.I., MARTIN, D.P., et al. (2009): Studies on the host range of the barley strain of Wheat dwarf virus using an agroinfectious viral clone. In: *Plant Pathology* (58), 1161-1169 p.
- REINHART, B. J., WEINSTEIN, E. G., RHOADES, M. W., BARTEL, B., BARTEL, D. P. (2002): MicroRNAs in plants. In: *Genes & development* (16), 1616–1626 p.
- ROOS, J., HOPKINS, R., KVARNHEDEN, A. ET AL. (2011): The impact of global warming on plant diseases and insect vectors in Sweden. In: *Eur J Plant Pathology* (129), 9–19 p.
- SATO, K. (2020): History and future perspectives of barley genomics. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* (27), 23 p.
- SCHWAB, R., OSSOWSKI, S., RIESTER, M., et al. (2006): Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. In: *The Plant cell* (18), 1121-1133 p.
- SZITTYA, G., SILHAVY, D., MOLNAR, A., et al. (2003): Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. In: *The EMBO journal* (22), 633-640 p.
- SZUNICS, L., POCSAI, E., VIDA, GY. (2000): Viral diseases on cereals in central Hungary. In: *Acta Agronomica Hungarica* (48), 237-250 p.
- TIWARI, M., SHARMA, D. és TRIVEDI, P.K. (2014): Artificial microRNA-mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. In: *Plant molecular biology* (86), 1-18 p.

- TSANOVA, T., STEFANOVA, L., TOPALOVA, L., ATANASOV, A., PANTCHEV, I. (2021): DNA-free gene editing in plants: a brief overview. In: *Biotechnology & Biotechnological Equipment* (35), 131-138 p.
- TZFIRA, T. & CITOVSKY, V. (2006): Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. In: *Current Opinion in Biotechnology* (17), 147-154 p.
- WANG, Y., DANG, M., HOU, H., MEI, Y., QIAN, Y., ZHOU, X. (2014): Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a mastrevirus. In: *The Journal of general virology* (95), 2082–2088 p.
- XIE, M., ZHANG, S., YU, B. (2015): microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. In: *Cellular and molecular life sciences* (72), 87–99 p.
- ZHANG, B. & WANG, Q. (2015): MicroRNA-Based Biotechnology for Plant Improvement. In: *Journal of Cellular Physiology* (230), 1–15 p.

## 9. Mellékletek

### 1. sz. melléklet: Eddig kialakított vírusrezisztencia növényekben CRISPR/Cas technológiával (Khan et al., 2022).

| Vírus neve                                                        | Nemzetség;<br>Család                           | Effektor<br>fehérje | Konstrukció<br>vektora                                                                                           | Célszekvencia<br>a régió     | Rezisztencia<br>szint                           | Gazdanövény                                          | A vírusiterek<br>%-os<br>csökkenése | Célszekvencia<br>mutáció % |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| DNS vírusok, direkt célszekvencia                                 |                                                |                     |                                                                                                                  |                              |                                                 |                                                      |                                     |                            |
| Bean yellow<br>dwarf virus                                        | <i>Mastervirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ;<br>sgRNS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                   | LIR                          | Enyhe tünetek                                   | <i>Nicotiana benthamiana</i>                         | 71                                  | 70                         |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | Rep/RepA                     | Enyhe tünetek                                   | <i>N. benthamiana</i>                                | 78                                  | 20                         |
| Beet severe<br>curly top<br>virus                                 | <i>Curtovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>    | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ;<br>sgRNS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                              | IR                           | Enyhe, vagy<br>nincsenek<br>tünetek             | <i>N. benthamiana</i>                                | 30–90                               | NA                         |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | CP                           | Enyhe tünetek                                   | <i>N. benthamiana</i>                                | 20–90                               | NA                         |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | Rep                          | Nincsenek<br>tünetek                            | <i>N. benthamiana</i><br><i>Arabidopsis thaliana</i> | 70–95                               | NA                         |
| Tomato<br>yellow                                                  | <i>Begomovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> és<br>TRV-mediált<br>sgRNS szállítás a<br>Cas9 expresszázó<br>transzgenikus<br>növényekben | IR                           | Enyhe, vagy<br>nincsenek<br>tünetek             | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | 36–42                      |
| leaf curl<br>virus<br>(TYLCV)                                     |                                                |                     |                                                                                                                  | CP                           | Súlyos tünetek                                  | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | 22–28                      |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | Rep                          | Súlyos tünetek                                  | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | 31–39                      |
| Cotton leaf<br>curl Kokhran<br>virus,<br>Merremia<br>mosaic virus | <i>Begomovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ;<br>Cas9 túlzott<br>expressziója és az<br>sgRNS TRV által<br>közvetített<br>szállítása    | CP                           | NA                                              | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | 18–49                      |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | Rep                          | NA                                              | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | 35–45                      |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | IR                           | NA                                              | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | NA                         |
| Tomato<br>yellow                                                  | <i>Begomovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ;<br>sgRNS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                              | CP                           | NA                                              | <i>Solanum lycopersicum</i>                          | 69                                  | 34–69                      |
| leaf curl<br>virus                                                |                                                |                     |                                                                                                                  | Rep                          | NA                                              | <i>S. lycopersicum</i>                               | 74                                  | 14–37                      |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | IR                           | NA                                              | <i>S. lycopersicum</i>                               | NA                                  | NA                         |
| Cotton leaf<br>curl Multan<br>virus                               | <i>Begomovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ; sgR<br>NS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                             | Rep + IR                     | Nincsenek<br>tünetek                            | <i>N. benthamiana</i>                                | NA                                  | NA                         |
| Wheat dwarf<br>virus                                              | <i>Mastrevirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ; sgR<br>NS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                             | MP/CP +<br>Rep/RepA +<br>LIR | Nincsenek<br>tünetek                            | Barley<br>( <i>Hordeum vulgare</i> L.)               | NA                                  | NA                         |
| Cotton leaf<br>curl virus<br>and<br>betasatellite                 | <i>Begomovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ; sgR<br>NS/Cas9;<br>transziens<br>expresszió                                              | Rep                          | Enyhe<br>(késleltetett<br>tünetek (2-4<br>nap)) | <i>N. benthamiana</i>                                | 40–70                               | NA                         |
|                                                                   |                                                |                     |                                                                                                                  | Rep + βC1                    | Enyhe<br>(késleltetett<br>tünetek (3-5<br>nap)) | <i>N. benthamiana</i>                                | 60–80                               | NA                         |
| African<br>cassava<br>mosaic virus                                | <i>Begomovirus</i> ;<br><i>Geminiviridae</i>   | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ; sgR<br>NS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                             | AC2/AC3<br>(TrAp/REn)        | Közepes, vagy<br>súlyos tünetek                 | Cassava                                              | 0                                   | 11                         |
| Cauliflower<br>mosaic virus                                       | <i>Caulimovirus</i> ;<br><i>Caulimoviridae</i> | SpCas9              | <i>A. tumefaciens</i> ; sgR<br>NS/Cas9;<br>transzgenikus<br>növények                                             | CP                           | 15% mutatott<br>tüneteket                       | <i>A. thaliana</i>                                   | 20–52                               | 43                         |

|                                                                                              |                                                                |           |                                                              |                                  |                                       |                                                  |        |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------|--------|-------|
| Banana streak virus                                                                          | <i>Badnavirus; Caulimoviridae</i>                              | SpCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | ORF1, 2, 3                       | 25% mutatott tüneteket                | Banana ( <i>Musa spp.</i> )                      |        | 70–85 |
| Chilli leaf curl virus                                                                       | <i>Begomovirus; Geminiviridae</i>                              | SpCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transziens expresszió    | C1/C4 + V1/V2                    | Nincsenek tünetek                     | <i>N. benthamiana</i>                            | 90     | NA    |
|                                                                                              |                                                                |           |                                                              | C1/C4 + IR                       | Nincsenek tünetek                     | <i>N. benthamiana</i>                            | 85     | NA    |
|                                                                                              |                                                                |           |                                                              | C1/C4 + V1/V2 + IR               | Enyhe tünetek                         | <i>N. benthamiana</i>                            | 70     | NA    |
| Gazdanövény módosítása                                                                       |                                                                |           |                                                              |                                  |                                       |                                                  |        |       |
| TYLCV                                                                                        | <i>Begomovirus; Geminiviridae</i>                              | SpCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | SlPelo                           | Nincsenek tünetek                     | <i>Solanum lycopersicum</i>                      | 90–100 | 10    |
| RNS vírusok, direkt célszekvencia                                                            |                                                                |           |                                                              |                                  |                                       |                                                  |        |       |
| Cucumber mosaic virus                                                                        | <i>Cucumovirus; Bromoviridae</i>                               | FnCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transziens expresszió    | ORF1a, ORF3a, 3'UTR              | Enyhe tünetek                         | <i>N. benthamiana</i>                            | 50–60  | NA    |
|                                                                                              |                                                                |           | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | ORF1a, ORF3a, 3'UTR              | Nincsenek tünetek                     | <i>A. thaliana</i>                               | 70–85  | NA    |
| Potato virus Y                                                                               | <i>Potyvirus; Potyviridae</i>                                  | LshCas13a | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNs/Cas13a; transzgénikus növények | P3, CI, Nib, CP                  | Nincsenek tünetek                     | Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> )              | 99     | NA    |
| TuMV                                                                                         | <i>Potyvirus; (Potyviridae)</i>                                | LshCas13a | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas13a; transziens expresszió  | Different location in TMV genome |                                       | <i>N. benthamiana</i>                            | 70–80  | NA    |
| Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV), Rice Stripe Mosaic Virus (RSMV)           | <i>Fijivirus (Reoviridae), Cytorhabdovirus (Rhabdoviridae)</i> | LshCas13a | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas13a; transzgénikus növények | Various locations in SRBSDV and  | Enyhe tünetek                         | Rice                                             | 60–80  | NA    |
|                                                                                              |                                                                |           |                                                              | RSMV genome                      |                                       |                                                  |        |       |
| Gazdanövény módosítása                                                                       |                                                                |           |                                                              |                                  |                                       |                                                  |        |       |
| Turnip mosaic virus (TuMV)                                                                   | <i>Potyvirus; Potyviridae</i>                                  | SpCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | eIF(iso)4E                       | Nincsenek tünetek                     | <i>A. thaliana</i>                               | 100    | NA    |
| Cucumber vein yellowing virus, Zucchini yellow mosaic virus, Papaya ring spot mosaic virus-W | <i>Ipomovirus;</i>                                             | SpCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | eIF4E                            | Nincsenek tünetek (homozigóta mutáns) | Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> L.)            | 100    | NA    |
|                                                                                              | <i>Potyvirus; Potyvirus; Potyviridae</i>                       |           |                                                              |                                  | Súlyos tünetek (heterozigóta mutáns)  |                                                  |        |       |
| Rice tungro spherical virus                                                                  | <i>Waikavirus; Secoviridae</i>                                 | SpCas9    | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | eIF4G                            | Rezisztens                            | Rice ( <i>Oryza sativa</i> var. indica cv. IR64) | NA     | 59    |
| Clover yellow vein virus                                                                     | <i>Potyvirus; Potyviridae</i>                                  | nCas9     | <i>A. tumefaciens</i> ; sgRNS/Cas9; transzgénikus növények   | eIF4E1                           | Teljes rezisztencia                   | <i>A. thaliana</i>                               | NA     | 31    |

## 2. sz. melléklet: Árpa in vitro regenerációjához használt táptalajok

| CI-0 táptalaj, pH=5,8 |              |
|-----------------------|--------------|
| Összetevő             | Koncentráció |
| MS (Duchefa, M02221)  | 4,3 g/l      |
| Réz                   | 1,25 mg/l    |
| Kazein hidrolizátum   | 1 g/l        |
| Myo-inozitol          | 250 mg/l     |
| Tiamin                | 1 mg/l       |
| Prolin                | 690 mg/l     |
| Maltóz                | 30 g/l       |
| Dicamba               | 2,5 mg/l     |
| Gelrite               | 3,5 g/l      |

| CI-50 táptalaj, pH=5,8 |              |
|------------------------|--------------|
| Összetevő              | Koncentráció |
| MS (Duchefa, M02221)   | 4,3 g/l      |
| Réz                    | 1,25 mg/l    |
| Kazein hidrolizátum    | 1 g/l        |
| Myo-inozitol           | 250 mg/l     |
| Tiamin                 | 1 mg/l       |
| Prolin                 | 690 mg/l     |
| Maltóz                 | 30 g/l       |
| Dicamba                | 2,5 mg/l     |
| Gelrite                | 3,5 g/l      |
| Hygromicin             | 50 mg/l      |
| Cefaotoxin             | 300 mg/l     |

| TR-50 táptalaj, pH=5,8          |              |
|---------------------------------|--------------|
| Összetevő                       | Koncentráció |
| MS (Duchefa, M0238)             | 2,7 g/l      |
| Réz                             | 1,25 mg/l    |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 165 mg/l     |
| Myo-inozitol                    | 100 mg/l     |
| Tiamin                          | 0,4 mg/l     |
| Glutamin                        | 750 mg/l     |
| Maltóz                          | 20 g/l       |
| 2,4-D                           | 2,5 mg/l     |
| BAP                             | 0,1 mg/l     |
| Gelrite                         | 3,5 g/l      |
| Hygromicin                      | 50 mg/l      |
| Cefaotoxin                      | 300 mg/l     |

| RG-0 táptalaj, pH=5,8           |              |
|---------------------------------|--------------|
| Összetevő                       | Koncentráció |
| MS (Duchefa, M0238)             | 2,7 g/l      |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | 165 mg/l     |
| Myo-inozitol                    | 100 mg/l     |
| Tiamin                          | 0,4 mg/l     |
| Glutamin                        | 750 mg/l     |
| Maltóz                          | 20 g/l       |
| Gelrite                         | 3,5 g/l      |

### 3. sz. melléklet: Egyéb táptalajok és pufferek

| 10x TBE puffer, pH=8,8                   |              |
|------------------------------------------|--------------|
| Összetevő                                | Koncentráció |
| Tris                                     | 162 g/l      |
| Bórsav                                   | 27,5 g/l     |
| Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O | 9,5 g/l      |

| YEB tápoldat, pH= 7,2 |              |
|-----------------------|--------------|
| Összetevő             | Koncentráció |
| Élesztő kivonat       | 1 g          |
| Szarvasmarha kivonat  | 5 g          |
| N-Z-Case Plus         | 5 g          |
| D-szacharóz           | 5 g          |
| Rifampicin            | 25 mg        |
| Kanamycin             | 50 mg        |

## 10. Nyilatkozatok

### NYILATKOZAT

#### a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Sorbán-Kiss Barbara

A Hallgató Neptun kódja: VSV512

A dolgozat címe: Búza törpülés vírus rezisztencia kialakítása árpában mesterséges miRNS és CRISPR/cas9 technológiákkal

A megjelenés éve: 2023

A konzulens tanszék neve: Növénybiotechnológiai Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemitulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: Gödöllő, 2023. május 9.



---

Hallgató aláírása

## KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam. A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom\*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem\*

Kelt: Gödöllő év 2023. hó 05. nap 09.



Belső konzulens