



**A szárazságtűrés élettani hátterének vizsgálata
Arabidopsis modellnövényen és transzgenikus
szárazságtűrő növények előállítása**

Doktori értekezés tézisei

Készítette: Bacsó Renáta

2010

A doktori iskola

Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
 egyetemi tanár, DSc
 Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
 Gyümölcstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Papp István
 Egyetemi docens, PhD
 Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
 Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

BEVEZETÉS

A kultúrnövények szárazságtűrése napjainkban igen égető probléma. Az öntözéshez használható édesvíz-készlet folyamatos csökkenése, a csapadékhiány és a globális felmelegedés egyre nagyobb szárazság-stressznek teszi ki termesztett növényeinket. Ebben a helyzetben fontossá vált a növények vízfelvevő és párologtató rendszerének minél jobb megismerése.

A szárazságtűrés fenotípusa rendkívül komplex, összehangolt élettani működés eredményeként alakul ki. A tudomány fejlődésével különböző módokon próbálták növelni a növények szárazságtűrését. A hagyományos nemesítés módszereit alkalmazva keresztezéssel és szelekciós stratégiákkal próbálnak kedvező tulajdonságú fajtákat előállítani (pl. a 218 309. magyar szabadalmi irat). A molekuláris biológia előretörésével egyre nagyobb szerepet kapnak a transzgenikus technikák, melyek segítségével könnyebben és gyorsabban megérthetőek azok a molekuláris szinten zajló folyamatok, melyek a növények szárazságtűrését döntően befolyásolják.

Munkánk során modellnövények segítségével foglalkozunk a növények vízvesztésével, párologtatásával. A növény vízvesztésének legnagyobb része párologtatással (transpirációval) történik. A párologtatás során a gázcsere nyílásokon és kisebb részt a kutikulán át elpárologtatott víz hiánya a növényben a gyökérszóna felé irányuló szívóerőt kelt. Ez a vízpotenciál csökkenés vezet a talajból az atmoszféra felé irányuló vízáramláshoz, a talajban lévő víz kinyeréséhez.

Az elpárologtatott víz mennyiségének, ezáltal a növény vízvesztésének fontos tényezői a sztomák nyílásának illetve záródásának mértéke, valamint a kutikula permeabilitása. Az abszcizinsav (ABA) számos stresszválaszban szerepet játszik, befolyásolja a gázcsere nyílások záródását, így stresszhormonként működik. Az abszcizinsavval végzett számos kutatás ellenére sem tisztázott még teljesen az aktivált

jelátvitel útja. Vizsgálataink során a *cbp20* ABA túlérzékenységet és szárazságtűrést okozó mutáció mechanizmusát, élettani következményeit terveztük vizsgálni.

Munkánk előzményeként lúdfűben (*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia) olyan ABA-túlérzékeny mutánst sikerült izolálni, mely fokozott szárazságtűrési tulajdonsággal is rendelkezik. A mutáns a vad típusnál valamivel lassabban fejlődik, kompaktabb, azonban ahhoz nagyon hasonló morfológiájú, fertilis növény. A mutáció az *Arabidopsis* At5g44200 génjében történt, ami a Cap Binding Protein 20 (CBP20) kódolja. A CBP20 a sejtmagi (nuclear) Cap Binding Complex (nCBC) része, amely az RNS Polimeráz II által átírt mRNS-ek 5' végére helyezett „cap” struktúrát köti. Az nCBC legalább kettő, 80 illetve 20 kiloDalton molekulatömegű alegységekből áll. A két alegység együtt képes az mRNS 5' struktúráját megkötni. Az nCBC-nak szerepet tulajdonítanak az mRNA splicingjában, annak 3' végének érésében, illetve az mRNS magból való exportjában.

Az nCBC működése az irodalomban publikált eredmények szerint növényekben nem létfontosságú, hiánya viszont a növény működését úgy változtatja meg, hogy az ABA-ra fokozottan érzékennyé és szárazságtűrőbbé válik. Az *abh1* és *cbp20* mutánsok ABA túlérzékenységet jelzi, hogy képtelenek csírázásra olyan alacsony koncentrációjú ABA mellett, mely a vad típusú növény csírázását nem gátolja. Mindkét mutáns jellemzője, hogy a vad típusú növényénél kevesebb vizet párologtat, ami ellenállóbbá teszi őket a szárazsággal szemben. Ezt a kedvező fenotípust a gázcsere nyílások gyors záródásával magyarázták, ami szintén ABA hatására következik be. A megváltozott RNS metabolizmus és vízháztartás a növény egyéb tulajdonságait csak kis mértékben érintik. Mivel a pleiotróp tulajdonságok ilyen kis fokúak, a mutáció gyakorlati hasznosítása is elképzelhető.

CÉLKITŰZÉS

- Munkánk során az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutáns széleskörű molekuláris biológiai és élettani vizsgálatát tűztük ki célul, valamint a mutáció célzott előidézését kezdtük meg paradicsomban. Együttműködő partnereinkkel közösen burgonyában és rizsben is elkezdjük *cbp20* géncsendesített vonalak létrehozását.
- A mutációhoz kapcsolódó molekuláris biológiai kísérletek a fenotípus kialakulásának mechanizmusát célozták. Az egyéb rendszerekben rendelkezésre álló információk alapján az mRNS metabolizmuson belül az alternatív splicingban próbáltuk szerepét vizsgálni.
- Élettani kísérleteinkben nyomon akartuk követni, vajon stresszmentes állapotban a mutáns csökkentett gázcseréjének milyen hatása van a növény hozamjellemzőire, fotoszintetikus aktivitására és a fotoszintetikus rendszer kapacitására. Megvizsgáltuk a normál állapotú, és a vízhiányos stressznek kitett növények élettani paramétereit, és azok változását. Mindemellett szeretnénk volna összehasonlítani a használt műszerek érzékenységét, és gyakorlati hasznosíthatóságukat is a vízhiányos állapot nyomon követésére.
- Az élettani vizsgálatok mellett a mutáns növény ökofiziológiai jellemzését is célul tűztük ki. Meg kívántuk vizsgálni, vajon előnyt vagy hátrányt jelent-e a genetikai változás egy heterogén növénypopulációban stresszhelyzet esetén.
- Célul tűztük ki a CBP20 ortológjának megtalálását paradicsomban, burgonyában és rizsben. Ezt követően géncsendesítő konstrukciókat terveztünk létrehozni génszabás technológiák segítségével, mely az *Arabidopsis CBP20* génnel nagy homológiát mutató paradicsom, burgonya és rizs géneket csendesítik.
- Kísérleteink során egy rutinszerűen alkalmazható paradicsom génmanipulációs rendszert terveztünk beállítani. Ehhez két különböző transzformációs rendszer honosítását terveztük, hogy összehasonlíthassuk azok hatékonyságát, illetve gyakorlati hasznosíthatóságát.

EREDMÉNYEK

Arabidopsis thaliana cv. Columbia vad típus és a *cbp20* mutáns fitness paramétereinek összehasonlítása

A föld és perlit keverékébe ültetett lúdfű növényeket felneveltük, majd teljes vízmegvonással szárazságstressznek tettük ki őket. A növények kezdeti vízpotenciál értékei szignifikánsan nem tértek el egymástól, a vízutánpótlás megszüntetése után jelentős különbséget a negyedik, illetve az ötödik naptól érzékelünk a kontroll (vad típusú) és a *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növények között. A mutáns növények vízpotenciálja a kísérlet végéig nem mutatott jelentős csökkenést a kezdeti értékhez képest, míg a vad típusú növények esetében a vízpotenciál értékek -5 Bar értékig is visszaestek.

A mutáns és kontroll növények fotoszintetikus aktivitását LCi készülékkel követtük nyomon. Jól öntözött állapotban nem volt megfigyelhető jelentős különbség a növények között, szárazság hatására azonban a hatodik naptól kezdve a mutáns fotoszintézise jelentősen aktívabb maradt a vad típusnál, bár a mutánsban is megfigyelhető volt az aktivitás fokozatos csökkenése.

A fotokémiai kioltás FMSII műszerrel mérve a kontroll (vad típusú) és mutáns mintákban is csökkent a harmadik naptól kezdve, a csökkenés azonban a kontroll növények esetében jóval jelentősebb lett a kísérlet végére. Szignifikáns különbséget azonban csak a hetedik napon tudtunk mérni. Az F_v/F_M érték fontos mutatója a fotoszintetikus rendszer működésének, azonban kísérleteink során mértéke csak a kontroll növényeknél, és csak erős szárazságstressz következtében csökkent mérhetően. A szárazságstressz korai hatásainak kimutatására nem volt alkalmas. A Φ_{PSII} paraméter a mérés ötödik napjától kezdett különbséget mutatni a két minta között, azonban a mérések nagy szórása miatt ez a paraméter nem bizonyult elég megbízhatónak. Statisztikailag értékelve az eredményeket azt találtunk, hogy csak a hetedik napon mérhető igazi különbség a Φ_{PSII} paraméterben a vad

típusú lúdfű, illetve a *cbp20* mutáns lúdfű között. A nem-fotokémiai kioltás a mutáns növényekben a kezdeti állapottól magasabb értéket mutatott mint a kontroll esetében. Ezek az értékek a szárazság hatására mindkét mintánál a negyedik, ötödik naptól kezdve emelkedni kezdtek. A vad típusú lúdfű a hatodik naptól kezdve mutatott egyezést a *cbp20* mutáns lúdfűvel a nem-fotokémiai kioltás tekintetében, azaz bizonyos szárazságstressz hatására – melyre a hatodik napon jutott el a növény – már a mutánsal egyenlő mértékben reagált ez a fotoszisztémát jellemző paraméter.

Termolumineszcencia paramétereiket is rögzítettünk a Hammatsu photomultiplier mérőfejjel ellátott, egyénileg összeállított műszer segítségével. A növények termolumineszcencia értékét megmértük a vízmegvonást megelőzően, optimális körülmények között, illetve stressznek kitett növények esetében. A görbék vad típusú és *cbp20* mutáns *Arabidopsis* növényekben a 9 napos szárazságstressz előtt nem mutattak jelentős eltérést. A vízmegvonást követően a *cbp20* mutáns TL görbéje 3000 egység körül mutatta a maximumát, ami 1500 egységgel kevesebb volt, mint normál vízellátottság mellett. A vad típusú lúdfű viszont még ennél is nagyobb visszaesést mutatott, egy viszonylag lineáris jelet kaptunk, mely 800 TL egység körül mozgott.

A föld gravimetrikus víztartalmát (GWC) a naponta mért földsúlyokból határoztuk meg. A mért értékek már három nap elteltével jelentős különbséget mutattak a kontroll és mutáns növények földjének súlya között, a mutáns növények földsúlya kisebb mértékben csökken mint a vad típusú kontroll növényeké.

***Az Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* és a vad fajta maghozamának, ezermag tömegének, friss súlyának és csírázóképeségének összehasonlítása**

Hogy megállapítsuk, okoz-e az általunk vizsgált *cbp20* mutáció bármilyen változást a termésmennyiség, illetve egyéb hozamértékmérő tulajdonságok alakulásában, összehasonlítottuk a vad típusú *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia illetve az *Arabidopsis*

thaliana cv. Columbia *cbp 20* magvak ilyen tulajdonságait. A vad típusú növények maghozama meghaladta a mutáns növények maghozamát, bár a mért értékek szórása is jóval magasabb volt

Az ezermag tömegeket illetve a friss tömegeket figyelembe véve nem találtunk különbséget a vad típusú (Col-0), illetve a mutáns (*cbp20*) növények között. Eltérés mutatkozott azonban a csírázóképeségben, míg a vad típusú növények átlag 57%-a csírázott ki kísérleti körülményeink között, addig a *cbp20* mutáns növényeknek mindössze a 28%-a.

***Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *cbp20* mutáns vizsgálatai a növények vegyes ültetése esetén**

A kísérlet során 9 növényt ültettünk egy tenyészedénybe, átlagosan 6,5 cm távolságra egymástól, azonos tömegű talajkeverékbe.

A felnőtt növényeket 8 napig szárazságstressznek tettük ki, és vizsgáltuk a növények stressztűréssel kapcsolatos élettani tulajdonságait. Az előzőekben leírt eredményekkel egybehangzóan külön tenyészedénybe ültetve és felnevelve, nyolc nap szárazságstressz után a vad típusú növények kiszáradtak, míg a mutánsok jelentősen zöldebbek, turgescensebbek maradtak. A növények gyökerének tömegét mérve megállapíthatjuk, hogy lényeges különbség nem mutatkozott a vad típusú, illetve a mutáns növények között .

Amikor külön tenyészedényben neveltük a vad típusú és a *cbp20* mutáns *Arabidopsis*-okat az előzőekkel egybehangzóan azt tapasztaltuk, hogy a mutánsok lassabban veszítettek vizet, így lassabban is száradtak ki mint a vad típusú növények. A közös tenyészedényben nevelt növények esetében viszont a hervadás látható jelei egyszerre jelentkeztek. A mért paraméterek közül itt a vízpotenciál értékek mindkét növényvonalban hasonló mértékben csökkentek a szárazságstressz előrehaladtával.

A külön illetve közös tenyészedényben nevelt növények talajának vízvesztését gravimetriásan is nyomon követtük. Ennek során a mutáns növényeket tartalmazó talajkeverék bizonyult a vízmegevonásos időszak végéig a legmagasabb víztartalmúnak, míg a vegyes ültetésű, és a tisztán vad típusú növényeket tartalmazó tenyészedényekben a víztartalom egyforma ütemben csökkent le.

Megvizsgáltuk az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *era-1* mutánst az előzőekben leírtakhoz hasonló kísérleti körülmények között, hogy bebizonyítsuk, a *cbp20* mutánsnál tapasztalt eredményeink nem csak ennek a mutánsnak egy kivételes tulajdonságát mutatják. Kilenc darab *era-1* mutánst ültettünk egy tenyészedénybe, egy másikba 9 darab Col-0 vad típust, míg egy harmadikba 5 vad típusú, és 4 mutáns növény került. A növények teljes fejlettségénél vízhiánynak tettük ki őket és nyomon követtük azok vízpotenciál értékeit. A kísérlet során a vízpotenciál értékek a csak *era-1* mutánst tartalmazó tálcában lévő növényeknél maradtak magasabbak, míg a vegyes, és a csak vad típust tartalmazó tálcák növényeinek vízpotenciál értékei lecsökkentek. A szemmel jól látható változásokat, amiket a Col-0 vad típusnál megfigyeltünk, az *era-1* mutáns nem mutatta a vízhiányos stressz hatására, levelei zöldek, vízzel jól ellátottak maradtak.

A növények vizsgálata csökkentett vízutánpótlás mellett

Természetes körülmények között az aszályos periódusok nem mindig jelentenek teljes vízhiányt, a nem kielégítő vízellátás is vízhiányos stresszt jelent a növény számára. Meg szeretnénk volna vizsgálni, vajon az ilyen, természeteshez közelebbi körülmények között is jelentkezik-e a kompetícióból adódó már megfigyelt hatás. Ennek modellezésére *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia és *cbp 20* mutáns növényeket az ismertetett összetételű földkeverékben felneveltünk, majd csökkentett vízutánpótlás mellett vizsgáltuk kölcsönhatásukat. A vad típusú, illetve a mutáns növényeket külön-külön, illetve közös

tenyészedényben felnevelve 2 hét kezelés során a vad típusú növények kiszáradtak, míg a mutánsok állapota nem változott jelentősen. A gyors kiszáritással azonos módon, a vad típusú növények közé ültetett mutánsok itt sem mutattak fokozott szárazságtűrést.

A gravimetrikus víztartalom értékek alapján a csak *cbp20* mutánst tartalmazó edények földkeverékének víztartalma a 12. napon még 50% körül volt, míg a csak vad típusú növények, és a vegyesen beültetett edények földkeverékének víztartalma 20-30% közé süllyedt.

A vízpotenciál értékeket nyomon követve is hasonló eredményeket kaptunk, mint a teljes vízmegvonás során. A csak *cbp20* mutáns növényeket tartalmazó tálcákban lévő növények vízpotenciál értéke jelentősen nem változott, míg a vegyes ültetésű tálcákban lévő növényeké - a mutáns növényeket is beleértve - lecsökkent.

A *CBP20* gén szerepének vizsgálata az alternatív splicing mechanizmusában

Mivel a *CBP20* gén az mRNS 5' cap kötését befolyásolja, de csak néhány gén mRNS mennyiségében mutatható ki különbség microarray technikával a mutáns és a vad típusú növények között, feltételeztük, hogy a *CBP20* gén más gének megnyilvánulását alternatív splicingon keresztül szabályozhatja. Ennek igazolására megpróbáltunk vad típusú és *cbp20* mutáns *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia növényekből olyan géneket kiválasztani, melyeknél ismert hogy mRNS-ük alternatív splicinggal érik.

A stresszválasz jelátviteli rendszereinek génjei közül választottunk ki néhány jelöltet, amelyeknél az alternatívan kivágódó intron genomi szekvenciájának két oldalára primereket terveztünk. Sajnos csak néhány gén vizsgálatára volt lehetőségünk, melyekről készült PCR termékek között nem találtunk a vad típusú és mutáns növények eltérő alternatív splicingjára utaló jelet a géleken.

Az *Arabidopsis CBP20* gén homológjának azonosítása paradicsomban és géncsendesítő konstrukció készítése

Az *Arabidopsis CBP20* gén homológiát kerestük paradicsom EST adatbázisban. Sikerült azonosítanunk egy olyan EST szekvenciát, mely nagy fokú homológiát mutat a *CBP20* génnel. Ennek csendesítésére fordított ismétlődést tartalmazó „hajtű” alakú génkonstrukciót terveztünk.

A paradicsom TC117999 jelű fehérjét kódoló gén egy szakaszát és egy spacer régiót a paradicsom össz RNS-ből átírt cDNS-ről PCR reakció segítségével a LeCBP1 - LeCBP2 primerekkel emeltük ki. Később publikált adatokból kiderült, hogy ez a szekvencia tulajdonképpen 2 EST-ből származik (TC 171884 és TC187934). A TC 171884 több szövetben is megtalálható a növényben, míg a nagyobb méretű TC187934-nek valószínűleg az ovárium, illetve a termés fejlődésében van funkciója. Szerencsére az általunk klónozott génszakasz mindkét génnel átfedést mutatott, így alkalmas volt a megfelelő géncsendesítő konstrukció létrehozására. A PCR termékeket GFX oszloppal tisztítottuk, és pKSII vektorba (ampicillin rezisztens) építettük be. *Escherichia coli* TOP10 törzséből a transzformációhoz kompetens sejtet készítettünk, majd ebbe transzformáltuk a pBluescript vektort a beépített génszakasszal együtt, hősokk módszert alkalmazva.

Az LB táptalajon kinőtt telepek közül a rekombinánsokat kék/fehér szín szelekcióval választottuk ki. Néhány rekombináns telepnél a beépített génszakasz meglétét ellenőriztük, közülük kiválasztottunk egyet, ahol a beépített génszakasz szekvenciáját meghatároztattuk, és ezt -70 °C-on glicerines oldatban tároltuk.

A fordított orientációjú beillesztéshez LeCBP3 és LeCBP4 primerekkel emeltük ki a paradicsom össz cDNS-ből RT-PCR segítségével a TC117999 EST egy másik szakaszát. Ennek segítségével elkészítettünk egy olyan génkonstrukciót, mely a paradicsomban csendesítendő gén egy részét, egy spacer régiót, és az adott génfragmentet fordított orientációban is tartalmazta. Ez az „inverted repeat” DNS szekvencia mRNS-é átírva

önmagával hajtú-struktúrát (ds RNS) képes kialakítani, ezáltal pedig hatékonyan beindíthatja a sejt természetes géncsendesítő mechanizmusát.

A kész konstrukciót a növénytranszformációra alkalmas pCP60 bináris plazmidba építettük át, majd *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe transzformáltuk.

Arabidopsis CBP20 gén homológjának azonosítása rizsben, és géncsendesítő konstrukció készítése

Bioinformatikai módszerrel, a BLAST algoritmust használva a rizs genomában egy az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *CBP20* génnel erősen homológ szekvenciát sikerült azonosítani (Os02g39890). A genomi DNS-ből PCR amplifikáció segítségével e gén megfelelő szakaszait felszaporítottuk CR1 és CR2 primerek segítségével. CR5 és CR6 indítoszekvenciákkal egy ezzel átfedő géndarabot intronnal együtt is kiemeltünk, így a paradicsomhoz alapjában hasonló, de egy intront is tartalmazó fordított tükörképi szekvencia kialakítása vált lehetségessé.

A PCR-el felszaporított cDNS darabokat pKS vektorba építettük, szekvenciáikat ellenőriztük, majd azokból fordított ismétlődésű konstrukciót készítettünk.

A konstrukciót ezután átemeltük pIP454 plazmidba, mely hygromycin rezisztenciája miatt szelektálható paradicsomban. A pIP454 a pCAMBIA1300 vektortól csak abban tér el, hogy CaMV35S promóter és terminátor kazettákat tartalmaz. Az elkészített pIP454 alapú rekombináns plazmidot *Escherichia coli* baktériumban sokszorosítottuk fel, és transzformáltuk át *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe, majd szerkezetét ismét ellenőriztük. Dr. Györgyey János kutatócsoportja sikeresen végzett ezzel a konstrukcióval rizs transzformálást, a transzgén jelenlétét kimutatták a növényekben, melyek biológiai tesztelése jelenleg is folyik.

A paradicsom transzformálás eredményei

Levél transzformáció

A paradicsom növény levél transzformációját az első lombszeletekkel végeztük. A baktériumos fertőzést követően a leveldarabokat MS táptalajon neveltük. A kalluszosodás mértéke 35%-os volt, mely új részek már ellenállóak voltak a használt antibiotikumokkal szemben. Az ezekből a részekből nevelt növényeknek csak nagyon kis része hozott gyökeret, és mindössze egy egyedét sikerült üvegházi körülmények között felnevelni.

Sziklevél transzformáció

A paradicsom sziklevél transzformáció során a levéltranszformációval szemben sokkal több leveldarabon jelent meg kallusz, és az ebből történő növényregeneráció is hatékonyabbnak bizonyult. A fertőzött részek 70%-a hozott antibiotikumra rezisztens kalluszt, és ezekből szintén nagy százalékban sikerült növényt nevelni, illetve gyökereztetni. Összesen 28 antibiotikum-rezisztenciát mutató növényt szelektáltunk és ülettünk ki üvegházba. Ezen növények molekuláris vizsgálatait végeztük el a transzformáció bizonyítására.

A paradicsom transzformálás igazolása PCR reakcióval

A növényi DNS minták ellenőrzésére paradicsom ubiquitin génre specifikus indítoszekvenciákat terveztünk, és ezekkel végeztünk kontroll PCR reakciót a mellékletben közölt kapcsolási hőmérsékletek használatával.

A transzformáció igazolására az NPT II markergénre tervezett PCR reakciót alkalmaztunk. Ez a vizsgálat elég érzékeny volt ahhoz, hogy a transzgént nagy biztonsággal kimutassa a növényi mintákból.

A kontroll ubiquitin génre készített indítószekvencia a PCR során minden növényi mintából képes volt felszaporítani a célszekvenciát, így bizonyítottuk a DNS kivonás és a PCR reakció alkalmasságát a transzgén kimutatására.

Az antibiotikum-ellenállóságot biztosító génre specifikus indítószekvenciák azokban az esetekben adtak pozitív jelet, amikor a növényi DNS tartalmazta a bejuttatott T-DNS-t, és így nagy valószínűséggel a géncsendesítő konstrukciót. A kísérlet eredményei alapján a 47. ábrán 1-7-ig jelölt minták bizonyultak transzformánsnak.

A kimutatást több alkalommal megismételve azonos eredményeket kaptunk. Összesen 20 esetben kaptunk pozitív jelet a minták elemzése során, így ezeknél a növényeknél bizonyítottuk a transzformáció sikerességét. A transzformálás hatékonysága 8%-os volt.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Bizonyítottuk különböző növényélettani vizsgálati módszerek, ill. műszerek alkalmazhatóságát a vízhiányos stressz nyomon követésében. Kimutattuk, hogy a gravimetrikus víztartalom, a vízpotenciál érték illetve a fotoszintetikus aktivitás mértékének változásai jelzik a legérzékenyebben a vízhiányt, már korai stádiumban is.
- A *cbp20* mutáns részletes vizsgálatával megállapítottuk, hogy ez esetben a gázcsere mértékének csökkenése nem befolyásolja kedvezőtlenül a fotoszintetikus aktivitást. Ugyanakkor vizsgálataink alapján a csökkentett párologtatás nem jelent előnyt a vízért való versengésben a vad genotípussal szemben.
- A CBP20 mutáns alegység szekvencia homológiájának alapján géncsendesítő transzformációs konstrukciókat készítettünk, melyek lehetővé teszik különböző gazdasági növények, így paradicsom, burgonya és rizs szárazságtűrő vonalainak létrehozását.
- Kidolgoztunk egy sziklevél alapú paradicsom transzformációs rendszert, és több független transzformáns vonalban igazoltuk a transzgén beépülését.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cap binding protein 20* (*cbp20*) egy olyan funkcióvesztéses mutáns, mely abszcizinsavra fokozottan érzékeny, csökkent párologtatású és szárazságtűrő fenotípussal rendelkezik. A magi *cap* kötő komplex, az nCBC egyik alegységében T-DNS inszercióval keletkezett mutáns a víz fokozott visszatartására képes a vízhiányos időszakokban.

Kutatásaink eredményeképpen bebizonyosodott, hogy a csökkentett párologtatás ellenére a *cbp20* mutáció nem befolyásolja hátrányosan a növény fotoszintézisét, ami a gátolt gázcsere egy lehetséges következménye lehetne. Ez a kedvező eredmény a mutáns növények termesztetőségét valószínűsíti. A mutáció jó vízellátásnál a vizsgált modellnövény fajban kedvezőtlenül befolyásolta a csírázási arányt és magszámot. Ezeket a jellemzőket haszonnövények módosítása esetében kiemelten vizsgálni kell. A normál vízellátottság mellett meghatározott további hozamparaméterek közül az ezermag tömeg és friss zöld tömeg azonosnak bizonyult a mutáns és a vad típusú növényeknél. Vízhiány esetén a mutáns előnye a vad típusú növényvel szemben nyilvánvaló, kísérleteinkben tartós vízmegvonáskor a vad típus pusztulását is túléli.

Mivel a növényi vízgazdálkodás jellemzésére a szakirodalomban több élettani folyamat különböző paramétereit használják, összevetettük ezeknek a paramétereknek az érzékenységét a szárazságstressz kimutatására *Arabidopsis* növényben. Megállapításaink szerint a szárazságstressz kimutatására a műszerekkel mérhető paraméterek különböző mértékben alkalmasak. A földszálmérésen alapuló gravimetrikus módszer, a vízpotenciál érték és a fotoszintetikus aktivitás mérése a szárazságstressz aránylag érzékeny mutatójának bizonyult. Kevésbé érzékenynek találtuk a fluoreszcencia indukció Φ_{PSII} paramétereit. Az F_V/F_M érték, a fotokémiai és nem fotokémiai kioltások csak erős vízhiány esetében változtak jelentősen.

Annak elemzésére, hogy a csökkent párologtatás okoz-e versenyelőnyt a mutáns növényeknek vízért való versengés esetén, kompetíciós helyzetben is megvizsgáltuk a növények szárazságstresszre adott válaszait. A víz visszatartása versenyhelyzetben nem jelentett előnyt az erőteljesebben párologtató (vad típusú) növényekkel szemben, feltételezhetően azért, mert a csökkent párologtatás során a talajban maradó vizet a vad típusú növények el tudták használni. Így a mutánsok a vad növényekkel azonos ütemben száradtak ki. Hasonló eredményeket kaptunk csökkentett vízutánpótlás adagolásakor, valamint egy eltérő genetikai háttérű ABA túlérzékeny, csökkentett párologtatású *Arabidopsis* mutáns (*era-1*) esetében is. Eredményeink felhívják a figyelmet a csökkentett párologtatásnak, mint elérendő biotechnológiai illetve nemesítési célnak egy gyengéjére. E szerint az ilyen fajták a vízért való versenyhelyzetben kedvező tulajdonságukat nem mutatják, előnyüket elvesztik. Eredményeinkből következtetést lehet levonni a szárazságtűrő mutánsok szelekciójának hatékony módszereire is.

Munkánk célja volt az *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia *cbp20* mutáns részletes élettani vizsgálatán túl annak felderítése, hogy haszonnövényekben működik-e hasonló nCBC szabályozási mechanizmus. Kíváncsiak voltunk, hogy vajon az *Arabidopsis CBP20* gén ortológjának géncsendesítésével szárazságtűrővé tehető-e egy ilyen gént hordozó haszonnövény. A transzgenikus technológiával folyó kísérletekbe három természetű növényfajt vontunk be: paradicsom, burgonya és rizs. E fajok genomjában illetve EST szekvenciáik között megkerestük az *Arabidopsis CBP20* gén feltételezett ortológjait. A paradicsom és burgonya szekvenciáikat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy azok 100%-os homológiát mutatnak. Így ebbe a két fajba ugyanazt a génkonstrukciót használhattuk. A szekvenciák alapján géncsendesítő konstrukciót terveztünk és készítettünk.

Mindhárom fajban sikeres génbejuttatás történt, amik közül a paradicsom transzformáció zajlott a laboratóriumunkban. Együttműködés keretében a burgonya

transzformációt a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban Dr. Bánfalvi Zsófia, a rizs transzformációt a Szegedi Biológiai Központban Dr. Györgyey János munkacsoportja végezte.

Az elért fenotípus értékelése eddig a géncsendesített burgonya esetében zárult le eredményesen. Ott az együttműködő partnerünk által végzett növénytranszformáció eredményeképpen a levágott burgonyalevelek csökkent vízvesztését figyelték meg a vad kontrollal szemben (Dr. Bánfalvi Zsófia személyes közlés). Ez bizonyítja, hogy az nCBC komplex működése egy természetett növényfajban is az általunk kívánt módon befolyásolható. A transzformált paradicsom és rizs vonalak tesztelése még folyik, azokból ilyen következtetések még nem vonhatók le.

Az eredmények gyakorlati hasznosítása a jövő biotechnológiai feladatai közé tartozik. Az általunk előállított génmódosított (GM) növényvonalak közvetlen bevonása nemesítési munkába nem célszerű. A GM növényfajták köztermesztése hazánkban, de más országokban is sok problémát vet fel. A *cbp20* mutánsok kedvező fenotípusa azonban egy gén funkciójának megszüntetésén alapul, így létezik olyan biotechnológiai módszer, amivel ezt a célt génmódosítás nélkül is el lehet érni. Az ún. TILLING módszerrel hagyományos módon mutagenizált populációban molekuláris eszközökkel kiválasztható egy megcélzott génre mutáns növényvonal. Ezzel a nem transzgenikus technológiával bármilyen fajban elvben lehetőség van GM mentes *cbp20* vonal előállítására.

Munkánk további célja a létrehozott transzgenikus paradicsom és burgonya vonalak vizsgálata. Ezek a géncsendesített vonalak biotechnológiai jelentőségük mellett segítséget adnak a mutáció hatásmechanizmusának felderítésében is, ami a laboratóriumunk egyik további fő kutatási iránya.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

Cikkek:

Bacsó R., Janda T., Galiba G., Papp I. (2008): Restricted transpiration may not result in improved drought tolerance in a competitive environment for water. *Plant Science*, 174: 200-204. (IF 1,974)

Bacsó R., Molnár A., Papp I., Janda T. (2008): Photosynthetic behaviour of *Arabidopsis* plants with a Cap Binding Protein 20 mutation under water stress conditions. *Photosynthetica*, 46: 268-272. (IF 1,000)

Bacsó R., Janda T., Galiba G., Papp I. (2008): Study of the fitness from the *cbp20* mutant *Arabidopsis*. *Cereal Research Communications*, 36: 2091-2094.

Bacsó R., Papp I. (2008) Investigation of the regulation of the *CBP20* gene in *Arabidopsis*. *Acta Biologica Szegediensis*, 52: 153-154.

Bacsó R., Bisztray Gy. D., Gyulay F., Facsar G., Velich I. (2004): Examinations of 600 years old seeds by means of archaeobotanical and genetical methods. *International Journal of Horticultural Science*, 10: 78-80.

Konferencia beszámolók:

Bodor P., Deák T., **Bacsó R.**, Velich I., Facsar G., Bisztray Gy. D. (2004): Morphological and genetic investigation of medieval grape seeds. *In vitro culture and horticultural breeding symposium*, Debrecen, 2004. szeptember 12-17., pp. 713-717.

Bisztray Gy. D., K. Bába E., Sz. Nagy L., Bodor P., Simonyi K., Deák T., Pánczél., **Bacsó R.**, Zarka V., Oláh R., Tóbiás I., Balog I., Velich I. (2005): Molekuláris növénynevelési módszerek alkalmazása kabakosoknál és szőlőnél. *XI. Növénynevelési Tudományos Napok*, Budapest, 2005. március 3-4., pp. 137-141.

Bacsó R., Molnár A., Papp I. (2007): Szárazságtűrés vizsgálata paradicsom és *Arabidopsis* növényekben. *Erdei Ferenc Tudományos Konferencia*, Kecskemét, 2007. augusztus 27-28., pp. 853-856.

Konferencia összefoglalók:

Bisztray Gy. D., Bodor P., **Bacsó R.**, Facsar G., Gyulay F., Velich I. (2004): Microsatellite investigations on archaeological grape seeds. *In vitro culture and horticultural breeding symposium*, Debrecen, 2004. szeptember 12-17., p. 213.

- Bisztray Gy. D., **Bacsó R.**, Bodor P., Facsar G., Gyulay F., Velich I. (2004): Archaeobotanical and genetical methods to analyse 600-year-old seeds of horticultural plants. *In vitro culture and horticultural breeding symposium*, Debrecen, 2004. szeptember 12-17., p. 212.
- Bacsó R.**, Bisztray Gy. D., Gyulay F., Facsar G., Velich I. (2004): Zsigmond-kori kútlelet archaeobotanikai vizsgálata. *X. Növénynevelési Tudományos Napok*, Budapest, 2004. február 18-19. (Szerk.: Sutka J.), p. 70.
- Bacsó R.** (2005): Zsigmond-kori kútlelet archaeobotanikai vizsgálata. *XXVII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia szekció*, Pécs, 2005. március 21-24., p. 84.
- Papp I., **Bacsó R.**, Koncz Cs. (2006): A magi *capkötő* komplex mutációja a növényekben a szárazságtűrést befolyásolja. *A Magyar Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése*, Pécs, 2006. augusztus 30 - szeptember 2., XXX. Évf. 3. szám, p.62.
- Bacsó R.**, Papp I. (2006): Abszcizinsav érzékenység változtatása a paradicsom szárazságtűrésének javítása érdekében. *XIII. Növénynevelési Tudományos Napok*, Budapest, 2006. március 12., p. 106.
- Bacsó R.**, Papp I. (2007): Géncsendesítési rendszer paradicsom hormonválaszának módosítása céljából. *VII. Magyar Genetikai Kongresszus*, Balatonfüred, 2007. április 15-17., p. 83.
- Bacsó R.**, Janda T., Molnár A., Nagy V., Marton B., Papp I. (2007): Szárazságtűrés és abszcizinsav jelátvitel vizsgálata paradicsom és *Arabidopsis* növényekben. „Lippay János-Ormos Imre-Vas Károly” *Tudományos Ülésszak*, Budapest, 2007. november 7-8., p. 294.
- Bacsó R.**, Molnár A., Janda T., Galiba G., Papp I. (2008): Improving drought tolerance by stomatal restriction of transpiration is not effective under competitive conditions for water. *International Network of Plant Abiotic Stress 1st workshop*, Matera, Olaszország, 2008. április 10-12., p. 39.
- Bacsó R.**, Janda T., Molnár A., Nagy V., Marton B., Papp I. (2008): Studies on ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis* and tomato. *First Symposium on Horticulture in Europe*, Bécs, Ausztria, 2008. február 17-20., p. 78.