

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

MÉSZÁROS ATTILA

SZEGED

2001

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR SZEGED
BIOKÉMIA TANSZÉK**

A BÚZA GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓJA

**Szerző:
Mészáros Attila**

**Konzulens:
Dr. Pauk János
tud. főmunkatárs**

SZEGED

2001.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés és célkitűzések	5
Rövidítések jegyzéke	8
1. Irodalmi áttekítés	9
1.1. A búza genetikai transzformációja	9
1.1.1. Sejttenyésztés és növényregeneráció	10
1.1.2. Vektor építés	11
1.1.3. A transzformáció módszerei	12
1.1.4. Hasznos gének búzában	15
1.1.5. A transzformáció paraméterei	17
1.2. A nitrát asszimilációja	18
1.2.1. A nitrát felvétele	19
1.2.2. A nitrát redukciója	20
1.2.2.1. A nitrátreduktáz enzim szerkezete	21
1.2.2.2. A nitrátreduktáz enzim működése	22
1.2.3. A nitrát asszimiláció vizsgálata mutáns egyedeken	26
1.2.3.1. Nitrát transzport mutánsok	27
1.2.3.2. Nitrátreduktáz mutánsok	28
1.2.4. A nitrát asszimiláció szabályozása	29
1.2.4.1. A nitrát felvételének szabályozása	29
1.2.4.2. A nitrát redukciójának szabályozása	31
1.2.4.2.1. Transzkripció szabályozás	31
1.2.4.2.1.1. Nitrátindukció	31
1.2.4.2.1.2. Szabályozás N-metabolitokkal	33
1.2.4.2.1.3. Szabályozás citokoninekkel	34
1.2.4.2.1.4. A fény és a cukrok szabályozó hatása	35
1.2.4.2.1.5. A napi ritmus szabályozó hatása	36
1.2.4.2.2. Poszttranszlációs szabályozás	36
2. Anyag és módszer	38
2.1. Növényanyag	38
2.2. A nitrát asszimiláció vizsgálata	38
2.2.1. Hidropóniás növénynevelés	38
2.2.2. A nitrát redukció szabályozása	39

2.2.3. A nitrát felvétel mérése.....	40
2.2.4. Nitrátreduktáz aktivitás meghatározás <i>in vivo</i>	41
2.2.5. Az enzimkinetikai állandók meghatározása	41
2.3. Transzgénikus búza előállítás.....	42
2.3.1. <i>In vitro</i> növénynevelés.....	42
2.3.2. Géntranszformáció.....	43
2.3.2.1. Transzformációs vektorok	43
2.3.3.2. Génbevitel	45
2.3.3.3. <i>In vitro</i> szelekció.....	46
2.3.2. A transzformáció ellenőrzése	47
2.3.2.1. β -glükuronidáz enzim teszt.....	47
2.3.2.2. Foszfinitricin acetiltranszferáz enzim teszt.....	47
2.3.2.3. Nitrátreduktáz aktivitás meghatározás <i>in vitro</i>	48
2.3.3. A növények felnevelése és vizsgálata.....	49
2.3.3.1. Az <i>in vitro</i> növényállomány felnevelése.....	49
2.3.3.2. Az utódnemzedékek felnevelése és <i>in vivo</i> szelekciója bar génre.....	50
2.3.3.3. A nitrátreduktáz enzim hatóképességének vizsgálata klorát teszttel ..	50
3. Eredmények	51
3.1. A nitrát asszimiláció vizsgálata	51
3.1.1. A nitrát felvétele	51
3.1.2. A nitrátreduktáz enzim szabályozása.....	54
3.1.2.1. A nitrát, a klorát és a glutamin hatása.....	54
3.1.2.2. A fény és a napi ciklus hatása	57
3.1.3. A nitrátreduktáz enzim kinetikai jellemzése.....	60
3.1.3.1. A kinetikai állandók meghatározása és a klorát gátlása.....	60
3.1.3.2. Az enzimaktivitás időbeni lefutása	62
3.1.4. A klorát toxikus tünetegyütes, klorát teszt	63
3.2. A búza genetikai transzformációja	69
3.2.1. Az <i>in vitro</i> tenyésztés körülményei	69
3.2.1.1. A búza genotípus kiválasztása	69
3.2.1.2. Az <i>in vitro</i> növény – sejt – növény rendszer a CY-45 genotípuson ...	70
3.2.2. Transzgénikus búza előállítás.....	71
3.2.2.1. Génbelövés.....	71
3.2.2.2. Szelekció és génexpresszió	72

3.2.2.3. Növényregeneráció	74
3.2.2.4. A transzgénikus növények in vivo vizsgálata	75
3.2.3. A transzgének vizsgálata az utódnemzedékekben	75
3.2.3.1. A transzgénikus növények foszfinotricin rezisztencia vizsgálata	76
3.2.3.2. A transzgénikus növények nitrátreduktáz aktivitás vizsgálata	78
3.2.3.3. A transzgénikus növények klorát rezisztencia vizsgálata	82
4. Következtetések	85
4.1. A nitrát asszimiláció vizsgálata	85
4.1.1. A nitrát felvétele	85
4.1.2. A nitrát redukciója	86
4.1.2.1. A nitrát a klorát és a glutamin hatása	87
4.1.2.2. A fény és a napi ciklus hatása	88
4.1.2.3. A nitrátreduktáz kinetikai jellemzése	89
4.1.3. A klorát toxikus tünetegyüttes, klorát teszt	90
4.2. A búza genetikai transzformációja	92
4.2.1. A genotípus kiválasztása és az explantátum eredete	92
4.2.2. Géntranszformáció	93
4.2.2.1. A gének bevitele	93
4.2.2.2. A transzformáció vizsgálata <i>in vitro</i>	95
4.2.2.3. A transzformáció vizsgálata <i>in vivo</i>	96
4.2.3. A transzgének vizsgálata az utódnemzedékekben	96
4.2.3.1. A foszfinotricin rezisztencia öröklődése	96
4.2.3.2. Csökkent nitrátreduktáz aktivitás megjelenése	97
4.2.3.3. A klorát kezelés hatása a transzgénikus utódnemzedékre	97
5. Összefoglalás	99
6. Summary	104
Köszönetnyilvánítás	109
Irodalomjegyzék	110

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az emberiség egyik legértékesebb, a legnagyobb területen és mennyiségben termesztett kultúrnövénye, kenyérgabonánk, a búza. A világ mezőgazdasági termelésében, 215 millió hektáros vetésterületével és megközelítően 600 millió tonnás éves termésmennyiségével (KSH, 2001), vezető helyet foglal el. Hazánkban közel 1 millió hektáron, az összes szántóterület mintegy egynegyedén, termesztenek búzát 3,2–4,0 t/ha éves országos termésátlaggal (KSH, 2000).

A búza őshazájának Elő-Ázsiát tartják, ahonnan a történelem előtti időkben terjedt el (Koltay és Balla, 1982). Hazánk területén a tárgyi emlékek bizonyága szerint már a bronzkorban ismerték. A magyarság letelepedését követően az idők folyamán, mint legfontosabb élelmiszerforrásunk, mezőgazdaságunk jellegzetes fő növényévé vált. Az ősi diploid és tetraploid fajok kereszteződésével jött létre a mai köztermesztésbe vont hexaploid búza (*Triticum aestivum* L.), a kenyérbúza (Barabás, 1987), mely ploiditási fokából adódóan kompenzálja a mutációs hatásokat, ugyanakkor a mesterségesen bejuttatott gének nagyobb variációs lehetőséggel nyilvánulhatnak meg benne. A tervszerű és tudatos nemesítés valamint az agrotechnika fejlődésének eredményeként alakultak ki a mai, korszerű igényeknek megfelelő fajták. A búzanemesítés legfontosabb szempontjai: a termőképesség növelése, kedvezőbb beltartalmi értékek (tartalék fehérje, siker tartalom) kialakítása és a stresszekkel szembeni ellenállás fokozása (Barabás, 1987.; Koltay és Balla, 1982).

A hagyományos nemesítési módszerek alkalmazása mellett egyre inkább előtérbe kerülnek a biotechnológiai fejlesztések, ezek között is kiemelkedő szerepet játszanak a genetikai manipuláció módszerei. Az *in vitro* technikát kezdetben merisztéma klónozásra használták, mely nagy számú genetikailag azonos növényegyed rövid idő alatti, kis helyigényű előállításával segítette a termesztést. A generatív sejtek *in vitro* tenyésztésével a haploid kultúrák révén nyert homozigota vonalak előállítása a keresztezéses nemesítés sok éves munkáját csökkentette le. A növényi genom módosítása kezdetben a sejtek és a sejtalkotók véletlenszerű transzportjával történt (protoplasztfúzió, cibridizáció stb.). Előrelépést jelentett a tudatosan, adott célnak megfelelően megtervezett és létrehozott genetikai vektorok bejuttatása a kísérleti genomba. A génbevitel technikai módszerei jelentős fejlődésen mentek keresztül,

melyek különböző módokon növelték a protoplaszt membránjának átjárhatóságát és ezzel a transzformáció hatékonyságát. Vegyszeres kezeléssel (PEG), és elektromos sokkal (elektroporáció) csökkentették a plazmamembrán ellenállását, vagy mikroorganizmus (*Agrobacterium tumifaciens*) szimbiota együtthatásával tették lehetővé a sikeres transzformációt. A mechanikus módszerek közül a mikroinjektálás terjedt el. Ma már a géntanszformációs kísérletekben a leggyakrabban génpuskát használnak, amellyel fém hordozóra felvitt DNS-t nagy nyomáskülönbséggel a sejtekbe „belőnek”.

A növénytermesztés hatékonyságát jelentős mértékben javítja a műtrágyák alkalmazása. Az intenzív típusú növényfajták elterjedése fokozott tápanyag igényük miatt megnövekedett műtrágya felhasználással jár együtt. A kijutatott műtrágyák egy része nem hasznosul a növények számára, így a talajban akkumulálódik, majd a talajvízzel a környezetet tovább szennyezi. A felhalmozottan ilyen módon összegyűlt kemikáliák mérgező hatást fejtenek ki. A műtrágyák egyik fő alkotórésze, a nitrogén nitrát formájában dúsul fel a környezetben. A nitrát fokozott asszimilációja, redukcióját követően, nitrit mérgezéshez vezethet. Hazánkban a mezőgazdaság műtrágya felhasználása 2000-ben 355 e tonna volt, melynek 73 %-a nitrogén műtrágya (KSH, 2000). Ez az összes mezőgazdasági művelésű terület vonatkozásában hektáronkénti átlagos 44 kg/év nitrogén hatóanyag felhasználást jelent. Az intenzív búzák termesztésénél a nitrogén műtrágya túladagolása nagyobb valószínűséggel bekövetkezhet, mert a termés értékét többek között a magas sikefehérje tartalom minősíti, ami még inkább nagyobb mennyiségű nitrogén utánpótlás kijuttatására készlet. A nitrát okozta környezetszennyezés csökkentésének egyik megoldása a nitrát kémiai átalakítása, redukciója nitritté, majd nitrogénné, mely a légkörbe távozik. E célból fejlesztettek ki és jó hatékonysággal alkalmaznak immobilizált nitrátreduktáz enzimrendszert talajvizek nitrát szennyeződésektől való tisztítására (Mellor et al., 1992). A másik lehetőség a környezetben feldúsuló nitrát eliminálására olyan növényfajták kifejlesztése, amelyek fokozott mértékben képesek a nitrát felvételére és hasznosítására. Ez a nitrátreduktáz gén módosításával, technikailag a kiválasztott növények genetikai transzformációjával valósítható meg.

Jelen kutatási munka célja egy olyan növény modell létrehozása volt, amely lehetőséget ad annak vizsgálatára, hogy egy adott genetikai elem célzott bevitelle milyen hatékonysággal valósítható meg, és megnyilvánulása milyen szinten és hogyan működik. Vizsgálatunk tárgyául a környezetvédelmi vonatkozásban és tápanyag hasznosítási szempontból is fontos nitrát asszimiláció egyik részfolyamatát, a nitrát – nitrit redukciót, katalizáló nitrátreduktáz enzimet választottuk. Az enzim termeléséért felelős gén szenz – antiszenz orientációjú módosítását végeztük búzában.

A genetikai transzformáció kísérleti körülményeinek meghatározása céljából munkánk első részében a nitrátreduktáz működését befolyásoló tényezőket vizsgáltuk.

- Feladatul tűztük ki, hogy a modellnövényként választott búzában meghatározzuk a szubsztrát nitrát, az inhibitor glutamin és a szubsztrátanalóg klorát pontos szerepét és hatásmechanizmusát a nitrát transzportjára és redukciójára vonatkozóan egyaránt.
- Fontos tényezőként vizsgálni szándékoztunk a fény és a napi életciklus befolyását a nitrát redukciójára, valamint az enzim aktivitás időbeni változását.
- Tanulmányozni kívántuk a klorátnak a növények fiziológiás állapotára kifejtett hatását. A klorát toxicitás megjelenési formáját, mint a klorát szenzitivitás–rezisztencia mértékét, a nitrátreduktáz aktivitás minősítése céljából véltük szükségesnek vizsgálni.

Munkánk második részét a gén transzformáció tervezése, kivitelezése és ellenőrzése képezte.

- Először a gén transzformáció szövettenyésztési paramétereit vizsgáltuk és határoztuk meg. Célunk volt a lehető leghatékonyabb módszer alkalmazása, melyben a leginkább alkalmas genotípus, explantátum, szövettenyésztő táptalajok és nevelési körülmények kiválasztását tűztük ki feladatul.
- A megbízhatóan működő növény–sejt–növény *in vitro* rendszer megalkotása után került sor a transzformálandó vektor és módszer kiválasztására, majd ezt követően a gén bevitelére. A genetikai transzformáció módszereként a mai hasonló témájú kutatásokban legnagyobb gyakorisággal és eredményességgel használt génbelövést alkalmaztuk. A hasznos gén (*cnx1* antiszenz) bevitelle a *gus* riporter gént és *bar* marker gént tartalmazó bináris plazmid kotranszformációjával búza éretlen embrió eredetű kallusztényészetébe történt.
- A transzformáció sikerességét különböző szinteken foszfinotricin rezisztenciára történő szelekcióval, nitrátreduktáz aktivitás mérésével és klorát teszttel ellenőriztük.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D–2,4 diklórfenoxi ecetsav	HMW–high molecular weight
AA–amino acid	IES–indolecetsav
ABA–abszcizinsav	KIN–kinetin
Act–aktin	LATS–low affinity transport system
<i>agn</i> –agglutinin gén	LUC–luciferáz
Asp–aszparaginsav	MoCo–molibdén kofaktor
BA–benziladenin	MPT–molibdopterin
<i>bar</i> –foszfinotricin acetiltranszferáz gén	MS–Murashige-Skoog
CaMV–Cauliflower Mosaic Virus	NADH–nikotinsav-amid-adenin- dinukleotid
CAT–kloramfenikol-acetiltranszferáz	NADPH–nikotinsav-amid-adenin- dinukleotid-foszfát
chl–klorát	NED–1-naftil-etiéndiamin
Cys–cisztein	Nia–nitrátreduktáz apoenzim
Cyt–citokrom	NiR–nitritreduktáz
DMSO–dimetil-szulfoxid	<i>npt</i> –neomicin-foszfo-transzferáz gén
EDTA–etilén-diamin-tetraecetsav	NR–nitrátreduktáz
<i>epsps</i> –5-enolpiruvilsikimát-3-foszfát- szintáz	NRA–nitrátreduktáz aktivitás
FAD–flavin-adenin-dinukleotid	Nrt–nitrát transzporter
GA ₃ –gibberelinsav	PAT–foszfinotricin acetiltranszferáz
GDH–glutaminsav dehidrogenáz	PEG–polietilénlikol
Gln–glutamin	PTT–foszfinotricin
Gln–glutamin	Ser–szerin
Glu–glutaminsav	Tyr–tirozin
GOGAT–glutamát szintáz	Ubi–ubiquitin
GS–glutamin szintetáz	<i>uidA</i> –β-glükuronidáz gén
GUS–β-glükuronidáz	XDH–xantindehidrogenáz
HATS–high affinity transport system	ZEA–zeatin
His–hisztidin	

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A búza genetikai transzformációja

Az utóbbi két évtized növényi biotechnológiai kutatásai azt mutatják, hogy a genetikai transzformációs módszerek legváltozatosabb formáinak folyamatos fejlesztésével a sikeres génátvitel számát hatványozottan növekszik. A rekombináns DNS technika alkalmazása a '80-as évek elején vette kezdetét kétszikűeknek *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette gén transzformációjával. Azóta számos kétszikű növényfajnál ez a módszer sikeresnek bizonyult (Uchimiya et al., 1989). A '90-es évek második felére már a modellkísérletek fokozatos fejlesztésével a kutatások eredményeit olyan nagy rutinnal használták, hogy a gazdaságilag hasznos gének bevitelével lehetővé vált genetikailag módosított új növényfajták előállítását a köztermesztés céljára. E nagy léptékű fejlődés ellenére az egyszikűeknél, ezek közül is a gazdaságilag legfontosabb kultúrnövényeink (kukorica, búza, rizs és árpa) esetében jelentős a lemaradás. Ennek egyik oka, hogy az *Agrobacterium* az egyszikűek transzformációjára kisebb hatáskörrel használható, ami már a kutatások korai időszakában lépéshátrányhoz vezetett a kétszikűekkel szemben.

A genetikai transzformáció folyamatában, ami egy idegen génnek a recipiens sejtbe bejuttatását, integrálódását, megnyilvánulását és öröklődését jelenti, nagyon fontos, hogy a transzformáns sejtek megőrizték szaporodó és regenerálódó képességüket. Ezért transzgenikus növényegyedek előállításának sikeressége alapvetően három tényezőtől függ. Mindenek előtt létre kell hozni egy megfelelő hatékonysággal működő növény – sejt – növény regenerációs *in vitro* rendszert. Ezt követően fel kell építeni egy az idegen gént hordozó olyan vektort, amely képes a gazda genomjába beépülni, működni és öröklődni. Végül meg kell választani és az adott feladathoz adaptálni kell a génbevitelnek azt a technikáját és paramétereit, ami a két transzformációs partner sikeres együttműködésének a leginkább megfelel.

1.1.1. Sejtenyésztés és növényregeneráció

Gabonafélék sikeres *in vitro* növényregenerációjára a legkorábbi fejlődési fázisban levő, „éretlen” sejtek, szövetek alkalmasak. Éretlen embrióból származó protoplasztok voltak az első sejtek, amelyek regenerációjával a növényi sejt totipotenciáját gabonafélékre is igazolták (Vasil és Vasil, 1980). Azóta a legkülönbözőbb explantátumokból, éretlen embrióból, fiatal virágzatból, levélkezdeményből, portokból, mikróspórából és hajtáscsúcsból, akár organogenezis, akár szomatikus embriogenezis indukciójával, egyaránt végeztek sikeres regenerációt (Gobel és Lorz, 1988; Vasil, 1988; Li et al., 1988; Pauk et al., 1991.; Qureshi et al., 1989; Redway et al., 1990). A transzformációs kísérletekhez is ezeket a sejteket, szöveteket használják, vagy az izolációjuk után közvetlenül, vagy embriogenezis indukcióját követően (Bommineni és Jauhar, 1997). Búza transzformációját az esetek jelentős részében éretlen embrióból (Weeks et al., 1993; Becker et al., 1994; Takumi és Shimada, 1996; Bommineni et al., 1997) vagy mikróspórából (Pauk et al., 1991; Zhou et al., 1993; Ingram et al., 1999) származó sejtenyészeteken végzik. A fiatal szövetekből dedifferenciálódó sejtek tenyésztése Murashige-Skoog (MS) alaptáptalajon történik (Murashige és Skoog, 1962), a sejtproliferációhoz 2,4 diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D) használnak, melynek optimális koncentrációja 2 mg/l (Zhang et al., 2000). Ez az a 2,4-D koncentráció, amely elég magas a sejtosztódás serkentéséhez, de elég alacsony is ahhoz, hogy a sejtek ne veszítsék el regenerálódó képességüket. Az embriogenezis serkentése és az azt követő regeneráció citokinin-auxin 1-1 arányú elegyében ugyanolyan összetételű táptalajon, a kifejlett *in vitro* hajtások gyökereztetése ½-es tápanyag koncentrációjú hormonmentes táptalajon valósítható meg a legkönnyebben (Vasil, 1988; Redway et al., 1990; Chang et al., 1991; Zhang et al., 2000). A szövettenyésztés minden fázisa kontrollált körülmények között zajlik. A sejtek tenyésztése sötétben, a növényregeneráció 16/8 fotoperiódusban hideg fény mellett történik. Fontos az *in vitro* tenyésztés időtartamának helyes megválasztása. Elegendő időt kell biztosítani a sejtek nagy léptékű felszaporításához, ugyanakkor a túl hosszú nyúlt kalluszképzés és szaporítás csökkenti a sejtek regenerálódó képességét, valamint növeli a szomaklonális variabilitás lehetőségét (Nehra et al., 1995).

1.1.2.Vektor építés

Egy idegen gén megnyilvánulását a növényi genomban számos tényező befolyásolja. Így a vektor beépülési helye a gazda növény genomjába, a transzformált gén másolatainak száma és szabályozó régiójának minősége (Nehra et al., 1995). A transzformáció sikeressége érdekében a transzformáció céljául szolgáló u.n. hasznos génen kívül a vektornak tartalmaznia kell az adott környezetben aktív promotert, a transzformáció megtörténtét jelző riporter gént és a vélhető transzformáns működőképességét bizonyító marker gént.

Az idegen gén fokozott megnyilvánulásának elősegítésére kétféle megoldás mutatkozik. Az egyik, az önmagában egyszikűeknél alacsony szinten működő konstitutív CaMV 35S promóter és a kódoló gészakasz közé egy intron beépítése, mely jelentősen növeli a promóter hatékonyságát és általa a gén megnyilvánulási szintjét búzában (Vasil et al., 1992; Becker et al., 1994). A másik konstrukciós lehetőség egyszikű konstitutív promoterek, mint a rizs aktin (Act1) promóter (McElroy et al., 1990) vagy a kukorica ubiquitin (Ubi1) promóter (Christensen et al., 1992) beépítése a vektorba.

A riporter gének működése olyan enzimreakciót indukál, melyek révén szubsztrátjuk bomlását követően színes vagy fluoreszkáló termékek megjelenése jelzi a transzformációs esemény bekövetkeztét. A legáltalánosabban használt riporter gének a β -glükuronidáz (GUS), a luciferáz (LUC) illetve a kloramfenikol-acetiltransferáz (CAT) enzimek szintézisét indítják be (Metz és Nap, 1997). A GUS aktivitást előidéző *uidA* gén használata általános, bár hátránya hogy kifejeződését követően – a transzformált sejtkolónia kékre festődése – a regenerációs képesség drasztikusan csökken.

A marker gének működése olyan enzimeket termel, melyek hatása valamilyen új, a vad típusban nem megtalálható tulajdonság megjelenésében nyilvánul meg. E tulajdonság alapján a transzformáns egyedek szelektálhatók. A szelekcós, marker gének három, hatásukban eltérő csoportját különböztetik meg, antibiotikum rezisztenciát és herbicid toleranciát okozó, valamint metabolitok képződését kiváltó szerepük szerint (Metz és Nap, 1997). Az antibiotikum rezisztencia gének közül gabonaféléknél a kanamicin hatását felfüggesztő *nptII* marker gént használják, mely többek véleménye szerint a búza nagyfokú kanamycin toleranciája miatt, annak szelekciójára kevésbé alkalmas (Hauptmann et al., 1988; Peng et al., 1992),

mindamelllett a transzformánsok regenerációs képességét nagy mértékben csökkenti. Transzformált búzában két herbicid rezisztenciát okozó gén is jól használható szelekciós markerként. A glifozát rezisztenciáért felelős növényi eredetű *epsps* gén a sikiminsav gyűrűs aminosavakká konvertálását gátló glifozát hatását függeszti fel azáltal, hogy a mutáns gén olyan hibás szerkezetű enzimet kódol, melyhez a glifozát nem tud kötődni. A foszfinotricin néven ismert glufozinát-amónium a glutamin szintetáz (GS) működését gátolja, ami az ammónia endogén felszaporodásához és általa végső soron a növényi sejt pusztulásához vezet. A búza transzformációs kutatásokban szelekciós markerként szinte kizárólagosan használt *bar* gén (Weeks et al., 1993; Zhou et al., 1993; Becker et al., 1994; Takumi és Shimada, 1996; Bommineni et al. 1997; Ingram et al., 1999; Zhang et al., 2000) a foszfinotricin-acetiltransferáz (PAT) enzim szintéziséért felel, amely acetilálja, és ezzel inaktíválja a foszfinotricint.

Mivel a transzformáció eredményeként az idegen gén stabil beépülése csak kis valószínűséggel következik be, ugyanakkor a transzformált sejtek regenerációs képessége elmarad az idegen gént nem tartalmazókéttól, nagyon hatékony és megbízhatóan működő szelekciós rendszerre van szükség. Ennek megtervezése kiterjed a szelektív ágens koncentrációjára, használatának időpontjára és időintervallumára, valamint ez utóbbikkal összefüggésben, a transzformált sejtenyészet életkorára.

1.1.3. A transzformáció módszerei

A géntanszformációs kutatások kezdetén a kísérletek tárgyai a *Solenaceae* család tagjai (dohány, petúnia, paradicsom burgonya stb.) voltak, melyek sejtenyészetéből a transzformációt követően könnyen regeneráltak transzgénikus növényeket. A gabonafélék genetikai transzformációjában az alapvető nehézséget nem a DNS bejuttatásának módja, hanem a transzformált sejtek tenyésztése jelenti.

Az idegen gének bevitelének kezdeti módszere a protoplaszt transzformáció volt. Életképes protoplasztok könnyen izolálhatók egyszikűek fiatal leveleinek mezofil szövetéből (Vasil és Vasil, 1987), továbbnevelésük viszont nem megoldott, mert nehezen osztódnak. A génbevitel eredményessége a membrán ellenállóképességének időleges felfüggesztésével növelhető. Ez kémiai (polietilén-glikolos kezelés), vagy fizikai (elektromos shock) behatással érhető el. A protoplasztok felnevelése

szuszpenziós sejtenyészetekben történik, melyből embriogenezist követően fejlődhetnek transzformáns növények. Az embrióképzés eredményessége genotípus és explantátum függő. A protoplaszból történő sikeres növényregenerációhoz az éretlen embrióból vagy portokból származó protoplasztok a legalkalmasabbak. Az első transzgenikus gabonaféléket rizs és kukorica éretlen embrió eredetű protoplasztjaiból nevelték fel. A DNS-t elektroporációval (Rhodes et al., 1988), vagy polietilén-glikol (PEG) kezeléssel (Zhang és Wu, 1988) juttatták be a protoplasztokba. Később transzgenikus árpat is sikeresen előállítottak PEG-kezelt protoplasztok szuszpenziós kultúrájából (Funatsuki et al. 1995). A protoplasztok tenyésztése a kis osztódási gyakoriság mellett elvárt megfelelő kihozatal miatt időigényes. A tenyésztési idő növekedésével csökken az embrióképzést indukáló képességük és nő a szomaklonális variabilitás lehetősége. Mindezek miatt, a módszer állandó fejlesztése mellett, egyéb géntranszformációs eljárások kifejlesztése vált szükségessé.

Az agrobaktérium közvetítésével végbemenő géntranszformáció az *Agrobacterium tumefaciens* talajbaktérium olyan különleges képességén alapul, hogy tumort indukáló plazmidja (Ti-plazmid) DNS-ét (T-DNS) a gazdanövény genomjába képes juttatni, amely abba beépül. A transzport a növény sebzési felületén történik, és tumoros hegeképződéssel jár együtt. A T-DNS működésének szabályozása a baktérium által kontrollált, többek között a növényi sejtek hatványozott szaporodására és növényi hormonok fokozott szintézisére irányul. A növények epidermiszét megsértve, az *Agrobacterium tumefaciens* fertőzéssel bejuttatott T-DNS-re épített vektor hatékony módszernek bizonyul a kétszikűek transzformációjában. Egyszikű növények a mechanikai behatásokra szklerotikus tünetekkel reagálnak, nem adva lehetőséget ezáltal a tumoros szöveteken keresztül zajló agrobaktériumos fertőzésre. Ez az oka annak, hogy az egyszikűek transzformációja sokáig eredménytelen maradt, és az első sikeres kétszikű transzformációt (Barton et al., 1983) csak tíz évvel követően hozott eredményt, amikor éretlen embriót fertőztek a vektor T-DNS-t hordozó agrobaktériummal, és állítottak elő transzformált rizst (Chan et al., 1993). A növény – baktérium anyagcsere-folyamatok kutatása kiderítette, hogy az agrobaktérium fertőzőképességét okozó virulencia gének, amelyek a T-DNS növényi sejtbe jutásáért felelősek, csak a növény sérülésre adott válaszreakciójaként képződő kémiai szignál (acetosziringon képződés) hatására működnek. Ez a felismerés tette lehetővé az egyszikűek és ennél fogva a gabonafélék agrobaktérium közvetítette hatékony genetikai transzformációját. Mutáns *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmidjából izolált,

túlműködést indukáló virulencia géneket építettek be bináris vektorba, mellyel lehetővé vált rizs transzformációja (Hiei et al., 1994). Másik, a transzformáció esélyét növelő módszer kétszikű sejtkivonat, vagy sziringon adása a sejttenyésztő tápoldathoz, mely révén árpa (Tingay et al., 1997) és búza (Cheng et al., 1997) agrobaktériumos transzformációját is megvalósították.

A legújabban kifejlesztett és ma már rutinszerűen használt gén transzformációs technika a génbelövés. A Cornell Egyetemen kifejlesztett "biolistics" néven ismertté vált módszer (Sanford et al., 1990.) direkt génbevitelt tesz lehetővé. A növényi sejttenyészeteket DNS-sel adszorbált 1-4 μm átmérőjű wolfram vagy arany részecskékkel, „mirolövedékekkel” „bombáznak”. A részecskéket elektromos árammal vagy vákuummal olyan nagy sebességre gyorsítják fel, hogy azok a sejtfalat áttörve a növényi sejtekbe bejuthassanak. A bekerült DNS által hordozott tulajdonságok megnyilvánulnak, és véletlenszerű rekombinációval a növényi genomba beépülhetnek. Az expresszáció megjelenését a hisztokémiai festődéssel detektálható riporter gén (pl. *gus*) hatása jelzi. Ez lehetőséget ad, a transzformált sejtek mennyisége és elhelyezkedése alapján, a művelet paramétereinek optimalizálására. A sikeres integrálódás a marker gén (pl. *bar*) okozta rezisztencia alapján mutatható ki. Részecskebelövással az első transzgenikus búzát Vasil és mtsai. (1992) regenerálták. A felnevelt növények a T_0 nemzedékben nem bizonyultak fertilisnek. Az utódnemzedékben is megnyilvánuló transzgen bevitelét Weeks és mtsai. (1993) végezték sikeresen, búza éretlen embrió eredetű 5 napos kallusztenyészetének belövésével. A transzformációs gyakoriság kevesebb, mint 1% volt, a növények felnevelése a transzformációt követően 6 hónapig tartott és a transzgen a T_1 nemzedékben is megjelent. A transzformáció eredményességét szerv dedifferenciálás nélkül, éretlen embriók közvetlen transzformációjával (Becker et al., 1994), ill. szkutellum, mint kalluszképző explantátum alkalmazásával (Nehra et al., 1994) növelték, 1%-nál nagyobb kihozatalra. Több kutatócsoport (Ingram et al., 1999; Rasco-Gaunt et al., 1999) is vizsgálta és meghatározta a génbelövő berendezés használatának optimális paramétereit, amelyek közül elsősorban a belövési úthossz, a nyomás és a vákuum nagysága, a hordozó mérete és a DNS felvitelének körülményei befolyásolják a transzformáció sikerét. A transzformációs táptalaj összetételének módosításával (megfelelő hormon koncentráció, ozmotikum alkalmazása), a legalkalmasabbnak vélt explantátum meghatározásával (szkutellum eredetű kallusz),

búza genetikai transzformációja a génbelövés módszerével 9-10%-os hatékonysággal is végezhető (Zhang et al., 2000).

Gabonafélék transzformációjára egyéb génbeviteli technikákat is sikerrel alkalmaztak, mint a makroinjektálás, mikroinjektálás, pollensatornán keresztüli génbevitel, elektroporáció, ultrahangos- vagy lézeres kezelés (Repellin et al., 2001), melyeknek továbbfejlesztése új utakat nyithat a gén transzformáció területén.

Ma a búza genetikai transzformációja a leghatásosabb módon génpuskával történik.

1.1.4. Hasznos gének búzában

Az utóbbi évtized növényi géntranszformációs kutatásainak eredményeként a legfontosabb gabonafélék körében számos transzgenikus növényvonalat állítottak elő. A szántóföldi kísérletek eredményeinek függvénye, hogy ezek új, transzgenikus fajtaként a köztermesztésben megjelenjenek.

Gabonafélék esetében a termesztésben hasznos, és géntranszformációval javított három, leginkább vizsgált tulajdonság: az ellenállóképesség, a magminőség és a morfológia (Repellin et al., 2001).

Az ellenállóképesség genetikai fejlesztése kiterjed a herbicid rezisztenciára és a kártevőkkel szembeni védelemre egyaránt. A gyomirtó szerekkel szembeni védelem háromféle biokémiai hatásmechanizmus szerint történhet (Stalker et al., 1988): a herbicid megkötésével, kémiai átalakításával vagy enzimes kötésének gátlásával. A herbicid rezisztenciát kialakító genetikai módosítás, ennek megfelelően, egy herbicid érzékeny hatóanyag túltermeltetésére, a herbicidet hatástalanító enzim szintézisére, vagy a herbicid által gátolt enzim mutáns változatát kódoló gén beültetésére irányul. Búza esetében glifozát (Roundup) és foszfinotricin (Basta) rezisztencia kialakításában érték el eredményt. *Triticum aestivum* L. Bob White fajtába Zhou és mtsai. (1993) az előbbi, több kutatócsoport (Weeks et al., 1993; Becker et al., 1994; Nehra et al., 1994) az utóbbi rezisztencia gént vitte be. Foszfinotricin rezisztens durum búzát (*Triticum turgidum* L.) Bommineni és mtsai. (1997) állítottak elő.

A kártevőkkel szembeni rezisztens gabonafélék közül a legnagyobb jelentősége a köztermesztésbe vont rovar rezisztens kukoricának van, melyet lepke kártétele ellen *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxint termelő génje véd (Kozziel et al., 1993).Búza

vonatkozásában a kórokozók széles skálája ellen történtek sikeres géntranszformációk. Chen és mtsai. (1999) rizs kitináz és taumatin-szerű fehérjék gén transzformációjával állítottak elő kalászfuzárium (*Fusarium graminearum*) rezisztens búzát. A másik, búza kártételében jelentős gomba, a levél és szárbetegséget okozó búza lisztharmat (*Erysiphe graminis*) elleni védekezést szintén a kitináz kódoló gén sikeres bevitele illetve germin-szerű fehérjék hatásának megnyilvánulása teheti lehetővé (Bliffeld et al. 1999; Schweizer et al., 1999).

A rovarok elleni rezisztencia terén elért eredményeket búzában két kutatócsoport (Alpeter et al., 1999; Stroger et al., 1999) munkái fémjelzik. Alpeter és mtsai. tripszin inhibitor működtetésével a búza mezei gabonamollyal (*Sitotroga cerealella*) szembeni védelmet fejlesztették ki. Stroger és mtsai. agglutinin gén (gna) transzformációjával levéltetű (*Sitobion avenae*) rezisztens növényeket kaptak.

A búza magminőségének javítása szempontjából a tartalékfehérjék és a keményítő játszik döntő szerepet. A gabonafélék közül a búzának a legnagyobb a fehérjetartalma, átlagosan 12 %, de elérheti a 20 %-ot is. A magfehérjék (gliadin és glutenin) a kenyér sikértartalmát határozzák meg, és a kenyértészta elaszticitását, gyúrhatóságát befolyásolva, közvetve hatnak a kenyér minőségére. A kenyértészta minőségét a glutenin nagymolekulatömegű frakciójának növelése javítja. A HMW (high molecular weight) glutenin termeléséért a búza B1 kromoszómán levő két alegység (1Ax1 és 1Dx5) felelős, melyek izolálását, klónozását és transzformációját több búza fajnál is sikerült megoldani. A közönséges kenyérbúzánál (Alpeter et al., 1996; Barro et al., 1997), tritikálénál és durum búzánál (He et al., 1999) valamint tritordeumnál (Rooke et al., 1999) egyaránt valamelyik transzgennek, vagy mindkettőnek a stabil integrációját figyelték meg, ami a kenyértészta nyúlóságában, szilárdságában is mérhető volt.

A keményítő a gabonamagvak szárazanyagának 50 – 80 %-át alkotja (Lásztity, 1996). Minőségét két alkotórészének (ammilóz és amilopektin) aránya határozza meg. Az amilopektin molekulák láncrövidülése olyan szerkezeti változásokat okoz, ami alacsony hőmérsékleten bekövetkező gélesedést és csökkent viszkozitást eredményez (Edwards et al., 1999). Ezek a tulajdonságok a kenyérgabonák sütőipari értékét növelik. A keményítőlánc átalakításáért, bontásáért felelős enzimeket kódoló gének irányított transzformációjával a keményítő szerkezet kedvezően módosítható (Lütticke et al., 1999; Barsby et al., 1999).

A növények morfológiája és fiziológiája nagyrészt kihat a termés hozamra és a termés minőségére is. A heterozis hatás (hybrid vigor) megnövelt termés hozamhoz vezet. Az önbeporzó növények hibridjeinek előállításához az anyai vonal hímsterilitását különböző in vivo módszerekkel (spontán mutáns szelekció, mutagén indukció, gametocid indukció) biztosítják (Barabás 1987). A barnase gén sikeres beültetésével in vitro hoztak létre hímsteril búzát (De Block et al., 1997). A regenerált növények hímsteril virágzatot fejlesztettek, és az önmegtermékenyülés híján a keresztbeporzás technikáját leegyszerűsítették.

1.1.5. A transzformáció paraméterei

Gabonafélék genetikai transzformációjának hatékonysága legfőképpen a következő szempontok figyelembe vételével növelhető (Repellin et al., 2001):

- a transzformációra és a regenerációra legalkalmasabb genotípus és explantátum kiválasztása;
- a szomaklonális variabilitás csökkentése a szövetenyésztés idejének lerövidítésével;
- érzékenyen megnyilvánuló riporter és jól szelektálható marker gén választása;
- közvetlen DNS beviteli módszer, mint a génbelövés;

Az eddigi kutatási eredmények alapján valószínűnek tűnik, hogy egyszikűek genetikai transzformációja éretlen embrió eredetű sejtvonalakkal a legeredményesebb. Az idegen gén bevitele génpuskával történik. A transzformáció sikerességének igazolására az integrálódás szintjén a *gus* gén, az expresszáció szintjén pedig valamilyen rezisztencia gén, praktikusán a transzformációs kísérletekben legtöbbször használt, így összehasonlításra is alapot adó *bar* gén az egyik legalkalmasabb. Kutató munkánknál, búza genetikai transzformációjához ezért ezt a modellt választottuk.

1.2. A nitrát asszimilációja

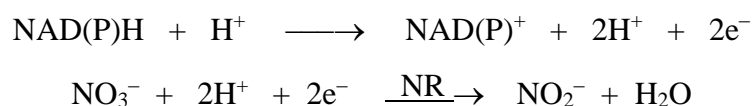
A növények nitrogén szükségletüket szerves nitrogénforrásokból fedezik. A talajban fellelhető két alapvető nitrogénforrás a szerves bomlástermékekből ammonifikálás útján képződő ammónia valamint az ammónia oxidációs-redukációs átalakulásának eredményeként keletkező molekuláris nitrogén. Az ammónia túlnyomó részét a talajlakó mikroorganizmusok saját anyagcserefolyamataikban felhasználják. A molekuláris nitrogén jelentős hányada a légkörbe távozik, visszamaradó része pedig csak azon kevés növény számára hozzáférhető, amelyek nitrogénkötő baktériumokkal (*Rhizobium* és *Azotobacter* fajok) szimbióta életformát alakítottak ki. A redukált nitrogénformákat az aerob mikroorganizmusok oxidálják, a nitrifikáció eredményeként a nitrogén legnagyobb része nitrát formájában áll a növények rendelkezésére. A növények ezért nitrogén igényüket alapvetően nitrát asszimilációjával biztosítják. A nitrát jelentős része a talajból erózió révén kimosódhat, más részét pedig a denitrifikáló baktériumok is hasznosítják. A hozzáférhető nitrát koncentrációja széles értékek között (10 μM -tól 100-mM-ig) változhat (Crawford, 1995). Ezért a növényeknek nagyon érzékeny, hatékonyan működő és jól szabályozott apparátussal kell rendelkezniük a nitrát felvételére és felhasználására.

A nitrát asszimilációja a növényekben három fő lépésben valósul meg:

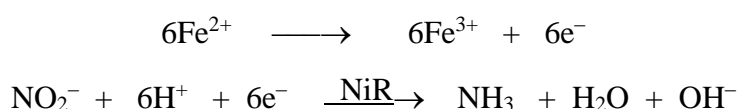
- a nitrát felvétele;
- a nitrát redukciója ammóniává;
- az ammónia beépítése anyagcsere intermedierekbe;

A nitrát a talajból a gyökérsejtekbe jut, ahonnan nagy része a növényi tápanyagszállító rendszeren keresztül a levelekbe szállítódik. A visszamaradó rész a gyökérsejt nitrogén anyagcseréjében vesz részt, fölöslege pedig a vakuolumban tárolódik. A nitrát felvétele a sejtek plazmamembránján keresztül aktív transzporttal történik. A sejt belsejébe nitrátranzportter (Nrt) enzimfehérje közvetítésével jut. A folyamat hajtóereje proton kotranszport (Crawford, 1995).

A nitrát redukciója ammóniává két lépésben valósul meg. Az első lépést a nitrátreduktáz (NR) enzim katalizálja, amely a nitrátot nitritté redukálja. A reakció 2 elektront igényel, melyeket NAD vagy NADPH redox koenzimek biztosítanak. A nitrát redukciója a citoplazmában játszódik le (Solomonson és Barber, 1990).



A második redukciós lépés a kloroplasztiszban vagy más plasztiszokban zajlik, ahol a nitritreduktáz (NiR) a nitritet ammóniává redukálja. A redukció 6 elektron szükségletét a kloroplaszt ferredoxinja illetve a plasztidok ferredoxin-szerű enzimje szolgáltatja (Suzuki et al., 1985).



Az ammónia α -ketoglutársav glutaminsav-dehidrogenáz (GDH) katalizálta direkt redukzív aminálásával, majd a glutamin-szintetáz (GS) és a glutamát-szintetáz (GOGAT) enzimek közreműködésével amidként illetve aminocsoportként épül be. A glutaminsav szolgáltatja az aminocsoportot a többi fehérjét felépítő aminosav számára.

1.2.1. A nitrát felvétele

A nitrát felvétel mechanizmusának sokoldalúnak és hatékornak kell lennie, mivel a növényeken belül nagy mennyiségű nitrát szállítására van szükség, hogy a külső kis nitrát koncentrációval szembeni nagy belső igénynek megfelelő mennyiség a rendelkezésre álljon. A hatékony működés érdekében a növények kifejlesztettek egy – a környezet nitrátkoncentrációjának ingadozásától független – aktív, szabályozott és sokfázisú szállító rendszert.

A nitrát felvétele a gyökérzet epidermális és kortikális sejtjeinek plazmamembránjain keresztül történik (Larsson és Ingemarsson, 1989). Ezt követi a tonoplaszt membránján való átjutás (Granstedt és Huffaker, 1982; Miller és Smith, 1992), valamint a szállítórendszer sejtjeinek, majd a levélsejtek plazmamembránján keresztüli transzport (Jackson et al., 1986). A nitrát felvétele elektromos potenciálgradienssel (-100mV) szemben valósul meg, melynek hajtóereje proton kotranszport. A proton-gradiens fenntartója a H^+ -ATP-áz enzim. A nitrát felvétele közben a membrán gyors és átmeneti depolarizációt szenved, ami a sejt belső

elektródpotenciáljának átmeneti, 1-2 perces + 60 mV-ra emelkedésével jár együtt (Tsay et al., 1993). A depolarizációhoz minden egyes nitrát ion bejutásakor legkevesebb két proton kotranszportja szükséges. A pH növelése a sejten kívül gátolja a nitrát felvételét, ugyanakkor a savanyúbb közeg elősegíti bejutását (Siddiqi et al., 1992; Ullrich és Novacky, 1990).

A nitrát felvételét a nitrátranzporter enzim (Nrt) katalizálja. Az enzim a nitrát koncentráció nagyságától függően két különböző rendszerben fejt ki hatását. Az egyik egy nagy affinitású rendszer (HATS = high-affinity nitrate system, $5 < K_m < 200 \mu\text{M}$), amely domináns a nitrát felvétele és transzportja szempontjából, és kis illetve közepes nitrát koncentráció (<1 mM) esetén működik. A másik egy kis affinitású rendszer (LATS = low-affinity nitrate system), amely közepesnél magasabb nitrát koncentráció mellett hatásos (Doddema és Telkamp, 1979; Hole et al., 1990). Kukorica és árpa gyökérzetének fiziológiás nitrát felvétele alapján kimutatták, hogy a kis affinitású rendszer (Nrt1) konstitutív, lineáris lefutású kinetika jellemzi (Hole et al., 1990; Siddiqi et al., 1990; Glass et al. 1992). A nagy affinitású rendszer, kinetikáját tekintve további kétféle transzporter (Nrt2:1 és Nrt2:2) működését állapították meg (Glass és Siddiqi, 1995). Az egyik nitrát által indukálható és transzkripciós szinten szabályzott, kinetikája telítési görbét mutat, a másik konstitutív. Mindkét rendszer feed-back szabályozás alatt áll: a gyökérben felszaporodó nitrát tartalom gátolja a nitrát felvételét (Hole et al., 1990; Siddiqi et al., 1990; King et al., 1992).

1.2.2. A nitrát redukciója

A nitrogén asszimiláció, a nitrát felvételét követő, második fő részfolyamata a nitrát redukciója ammóniává. A nitrátredukció első és sebességmeghatározó lépése a nitrátnak nitritté történő átalakítása. Ez a folyamat egyidejűleg és egymással kölcsönhatásban folyik a nitrát sejtből való kiáramlásával és a vakuolumba történő transzportjával. A három folyamat egymáshoz való viszonya a nitrát koncentráció által szabályzott (Hoff et al., 1994). A nitrát redukcióját katalizáló nitrátreduktáz (NR) elsődlegesen a gyökér epidermisz és kortikális sejtjeinek citoszoljában valamint a szár mezofil sejtjeiben helyezkedik el (Fedorova et al., 1994).

1.2.2.1. A nitrátreduktáz enzim szerkezete

A nitrátreduktáz enzim (NR) az oxidoreduktázok osztályába tartozik. Az enzim elektrondonorja a NADH vagy a NADPH lehet.

Az eukariótáknál az enzim három szerkezeti formában fordul elő, aszerint, hogy csak a két elektrondonor valamelyikét, vagy bármelyiket képes megkötni (Streit et al., 1987). Ennek megfelelően a 2. alosztályon belül három különböző folyószámon tartják nyilván:

- NADH:NR (E.C. 1.6.6.1.) $pH_{opt} = 7.5$
- NAD(P)H:NR (E.C. 1.6.6.2.) $pH_{opt} = 6.5$
- NADPH:NR (E.C. 1.6.6.3.) $pH_{opt} = 5.8$

Az első és a harmadik forma monospecifikus, azaz az elektrontranszport láncban NADH illetve NADPH redox koenzimet tudnak kötni. A második forma egyaránt képes NADH-val és NADPH-val is kapcsolódni, ezért bispecifikus.

A magasabbrendű növényekben mindhárom izoform dimer szerkezetű, a működő enzim teljes szerkezetét két kapcsolódó egység alkotja. Ennek megfelelően az első és a harmadik forma homodimer a második forma pedig homo- és heterodimer szerkezetű lehet. Az első forma elterjedten fordul elő a magasabbrendű növények között. A második forma heterodimer alakja többek között megtalálható a kukoricában, az árpában, a rizsben és a szójában (Redinbaugh és Campbell, 1981; Streit et al., 1987; Kleinhofs és Warner, 1990), homodimer változata pedig pl. a nyír leveleiben (Friemann et al., 1991). A harmadik forma magasabbrendű növényekben nem fordul elő, csak gombákban és moszatokban (Guerro et al., 1981; Padidam et al., 1991).

A dimerek mindkét alegysége 100-120 kD molekulatömegű (Solomonson és Barber, 1990) és 881-től (bab) 926-ig (spenót) számú aminosavat tartalmaz (Srivastava és Shankar, 1996). Az alegységeket felépítő aminosavak közül a savas jellegűek vannak többségben a bázikusokhoz képest; pl. a tök NR izoelektromos pontját pl. 5.7-nek találták (Redinbaugh és Campbell, 1985). A dimér szerkezeté való összekapcsolódást diszulfid-hidak biztosítják (Hoff et al., 1992).

Az alegységeket három-három domén alkotja, melyek mindegyike megköt egy-egy proszтетikus csoportot (Solomonson és Barber 1990). Ezek a proszтетikus csoportok a felelősek a redox folyamat (elektronátvitel) katalíziséért. A katalitikus doménok helye és sorrendje meghatározott. Az egyes proszтетikus csoportokat kötő

aminosav szekvencia homológiát mutat más enzimek (citokrom b5 reduktáz, citokrom b5- és szulfioxidáz) ugyanazon prosztetikus csoportokat kötő aminosav szekvenciáival (Calza et al., 1987; Crawford et al., 1988; Neame és Barber, 1989). A polipeptid lánc N-terminális részéhez egy molibdén tartalmú kofaktor (MoCo), a középső szakaszhoz egy hem molekula (Cyt b₅₅₇), C-terminális részéhez pedig FAD koenzim kapcsolódik (Redinbaugh és Campbell, 1985).

1.2.2.2. A nitrátreduktáz enzim működése

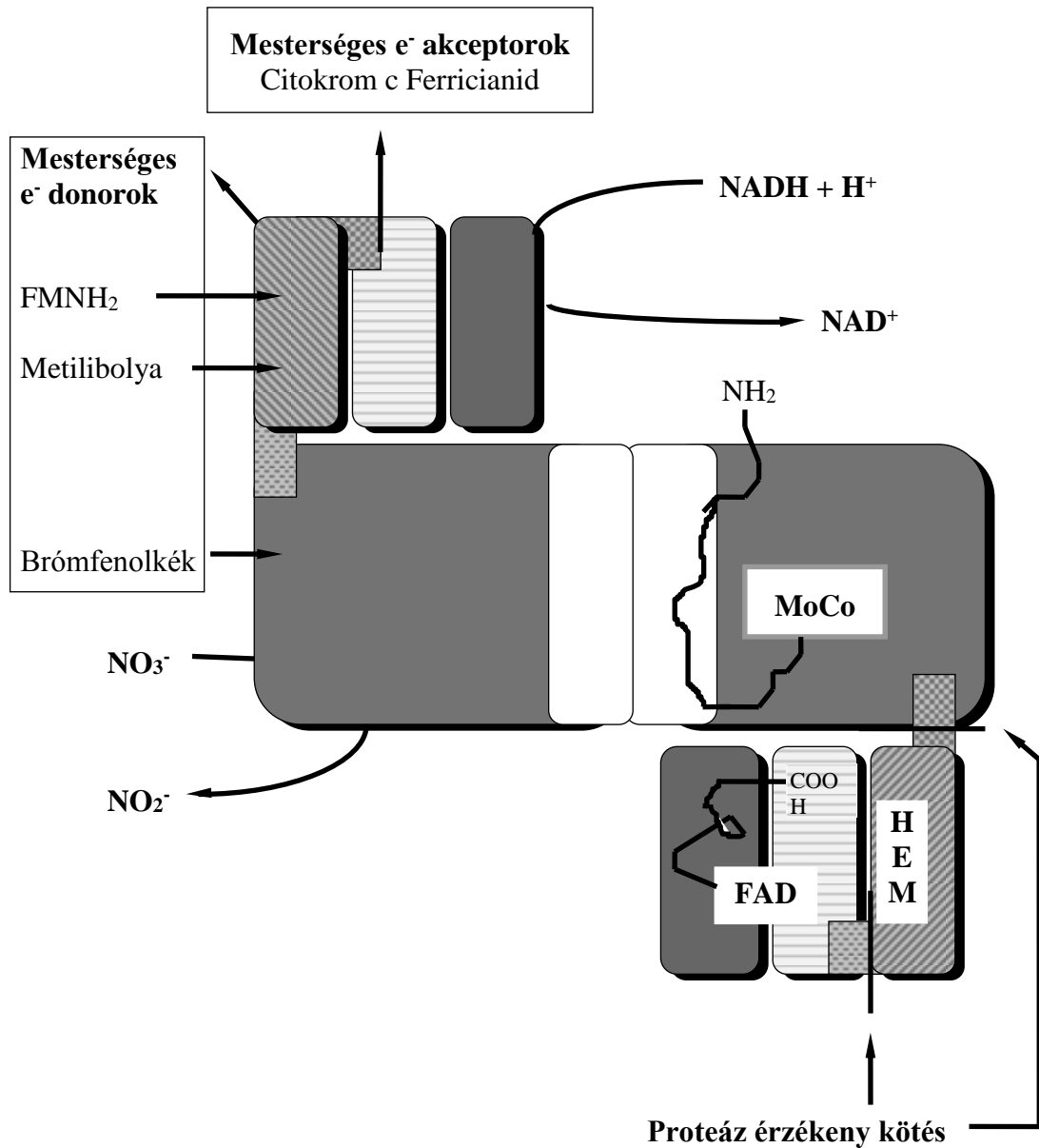
A nitrát redukciója nitritté egy többlépéses redoxi reakció, amelynek során a nitrátreduktáz három doménjén elektrontranszport megy végbe. Az enzim a polipeptidlánc két végén egy-egy aktív centrummal rendelkezik. A C-terminális az elektrontranszport lánc kezdete. Aktív centrumában a NAD(P)H elektronokat ad át a FAD-nak, melyek a Cyt b₅₅₇ közvetítésével jutnak az N-terminális aktív centrumába. Itt a MoCo segítségével kerülnek át a nitrátra, mely így nitritté redukálódik (Srivastava és Shankar, 1996). Ennek megfelelően az elektronátvitel útja:



A redox folyamat sebességmeghatározó lépése a hemről a MoCo-ra való elektronátvitel (Campbell, 1996). A MoCo doménról úgy vélik, hogy magasabbrendű növényekben az enzim alegységek dimerizálásáért is felelős. *Chlorella*-ban, ahol a magasabbrendű növényekkel ellentétben a NR homotetramer (Howard és Solomonson, 1982), a hem doménnek van szerepe az alegységek összekapcsolásában. Az 1. ábra a nitrátreduktáz szerkezetét és az elektronátvitel lehetséges módjait mutatja (Hoff et al., 1994).

A nitrátnak a fiziológiásan lezajló, NAD(P)H – mint elektrondonor – közvetítésével végbemenő redukciója mellett a nitrátreduktáz enzim több részaktivitással bír in vitro, melyek mesterséges elektrondonorok/-akceptorok hatására nyilvánulhatnak meg (Hoff et al., 1994). Ezek a vegyületek egy vagy több prosztetikus csoportra – az enzim egy vagy több doménjére – képesek hatni. A részleges enzimaktivitás alapvetően kétféle lehet: NADH dehidrogenáz (diaforáz) aktivitás és terminális nitrátreduktáz aktivitás. A dehidrogenáz aktivitás a NAD(P)H-ról visz át elektronokat és redukál számos mesterséges elektronakceptort, mint a ferricianid és a citokrom c. A terminális nitrátreduktáz aktivitás a nitrátnak nitritté való redukcióját ez

esetben oly módon teszi lehetővé, hogy az elektronokat mesterséges elektrondonorok szolgáltatják, mint a metilibolya, a redukált brómfenolkék és a flavin nukleotidok.



1. ábra A nitrátreduktáz szerkezeti modellje

A nitrátreduktáz sematikus szerkezeti ábrázolásában látható az enzim dimer szerkezete, melynek 3-3 doménje a fehérjelánc C-terminálisától az N-terminálisig sorrendben FAD, hem és MoCo prosztetikus csoportokat köt meg. A domének közötti kötés proteázokkal hasítható és önálló működőképes egységekké bontható. A mesterséges elektrondonorok és -akceptorok a domének különböző részaktivitásának megfelelően hatnak, amelyet a nyilak jeleznek. A nitrát redukciója a MoCo doménon történik, az elektronokat NADH szolgáltatja, melyeket a FAD domén vesz fel.

(Hoff et al. 1994. nyomán)

Az enzim korlátozott proteolízisét követő analízis során spenót NR fragmentumainak kapcsolódási sorrendjét valamint aminosav szekvenciáit vizsgálták, és határozták meg. Megállapították, hogy a domének különböző speciális proteáz-érzékeny kötési régiók által kapcsolódtak. Az enzim három doménje két kötésen keresztül kapcsolódik; az egyik a MoCo és a citokróm a másik a citokróm és a FAD kötő helye között található (Bachmann et al., 1996). A polipeptidlánc három részre bontható az adott, arra alkalmas speciális proteázokkal való kezeléssel. A három elválasztott domén mindegyike az enzim részleges aktivitását mutatja, az egyes domének redukáló tulajdonságukat egymástól függetlenül is képesek kifejteni (Crawford et al., 1988; Redinbaugh és Campbell, 1985; Solomonson és Barber, 1990).

A NR doménjeinek aminosav szekvenciáját a domének hatásához hasonló funkciójú enzimek aminosav sorrendjével való összehasonlítással határozták meg (Campbell és Kinghorn, 1990). Azt találták, hogy a NR N-terminális részének aminosav sorrendje hasonló az emlősök szulfitoxidáz enzimjének MoCo kofaktor kötő helyének szekvenciájával. A NR középső része hasonló az emlős és növényi Cyt b₅ ill. hem-Fe fehérjéhez, míg a C-terminális régió hasonló az emlős Cb₅R FAD tartalmú enzimhez.

Különböző eredetű NR aminosavszekvenciákat összehasonlítva, összesen két Cys oldallánc volt az, amely minden polipeptid lánc azonos helyén megtalálható volt (Dwivedi et al., 1994). Az egyik a MoCo részt kötő fragmentumnál a másik pedig a NADH-t kapcsoló résznél található. Az N-terminális résznél levő Cys-t *Aspergillus*-ban egy helyspecifikus mutagenézissel Ala-ra cserélték le, mely a NR aktivitás teljes elvesztését jelentette (Garde et al., 1995). Az aktivitás mesterséges elektrondonorok (redukált festékek) adásával sem volt visszaállítható. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a Cys oldallánc jelenléte nélkülözhetetlen a NR aktivitás szempontjából, és úgy vélték, hogy, a MoCo peptidlánchoz való kapcsolásáért felelős (Solomonson és Barber, 1990). A NR NADH aktív helyén levő másik Cys aminosav Ser cseréjével, illetve a tiolcsoport blokkolásával enzimkinetikai analízissel kimutatták, hogy a Cys tiolcsoportja nem a NADH megkötésében játszik szerepet, hanem mint katalitikus aktív hely a NADH-ról FAD-ra történő elektrontranszportban. Szerepét azáltal fejté ki, hogy olyan helyet foglal el – az aktív enzim specifikus térszerkezete miatt tiolcsoportjának a NADH karboxiamid csoportjával tud kapcsolódni –, mely révén elősegíti a NADH-ról a FAD-ra történő elektronátadást (Dwivedi et al., 1994). Ha a Cys helyére Ser kerül, annak OH végcsoportja másodlagos hidrogénhid kötést képes

létesíteni a polipeptid lánc 147. egységével és ez kedvezőtlenebb a NADH optimális térbeli elhelyezkedése, így az enzim katalitikus hatásának megnyilvánulása szempontjából (Lu et al., 1995). Ugyancsak meghatározó szerepe van a Ser534 aminosavnak, amely az enzim MoCo és Cyt b₅₅₇ kötő doménje között az 1. proteáz érzékeny kötésben található (Bachmann et al., 1996.). A Ser534 az enzim foszfátcsoport kötő helye, és mint ilyen felelős az enzim működés poszttranszlációs szabályozásáért.

A két különböző piridin nukleotid (NADH és NADPH) specifikus kötődését szintén az enzim térszerkezete magyarázza, és a kötőhely szomszédságában található aminosavak jellegétől függ. Kukoricában vizsgálva azt tapasztalták (Lu et al., 1995), hogy ha a kötőhely közelében savas tulajdonságú, így negatív töltésű aminosavak (Glu, Asp) találhatóak, akkor a NADPH kötődése – az ADP rész 2'-OH-jára kapcsolódó foszfát negatív töltése miatt – gátolt. Ez esetben ezért csak a NADH lehet az elektrondonor. Ebből következik, hogy az enzim C-terminális részén levő dikarboxi-aminosavak túlsúlya/hiánya határozza meg a három izoenzim szerkezeti specifitását. Ha a kötőhely közelében negatív töltésű aminosavak vannak, akkor a NADH molekula megkötődhet, a NADPH kapcsolódása pedig gátolt. A NADPH specifikus kötőhely környezetében a savas aminosavak helyén magasabbrendű növények és gombák elsődleges szerkezetét vizsgálva Tyr-t vagy Ser-t találtak. A negatív oldalláncok taszító hatása hiányában itt a NADPH meg tud kötődni. Gombák és moszatok esetében az enzim C-terminális része negatív töltésű, savas aminosavakat nem tartalmaz. Ez az oka, hogy ezeknél az élőlényeknél a NR NADPH homodimerje fordul elő.

A nitrát közvetlen redukciójáért NAD(P)H koenzim megkötésével az enzimfehérje N-terminális részén lévő molibdén kofaktor (MoCo) a felelős. A MoCo működésében ez elektronok transzportját a molibdén atom végzi, amely egy pterinvázis vegyület, a molibdopterin (MPT) központi atomját alkotja (Rajagopalan és Johnson, 1992). A MoCo, a terminális rész doménjának kofaktoraként, a fehérjelánchoz kötött a MPT és a Mo *in situ* összekapcsolódásával jön létre (Mendel, 1997). A Mo biokémiájának genetikai analízise Pateman és mtsai munkájával (Pateman et al., 1964) kezdődött, akik analizálták az *Aspergillus nidulans* NR mutánsát és megállapították, hogy egy egyszeri mutáció két Mo-enzim a NR és a xantindehidrogenáz (XDH) egyidejű elvesztésével jár. Mivel a MoCo volt az egyetlen közös kapocs a két – nagyon különböző szubsztrátspecifitású – enzim között, feltételezték, hogy mindkét enzim ugyanazt a Mo kofaktort tartalmazza. Az analízis

során 5 lókuszban kódolva találták meg a kofaktor termeléséért felelős enzimek génjeit, melyeket *cnx* (cofactor for nitrate reductase and xantin dehydrogenase) jelöléssel láttak el. A MoCo bioszintézisének fő lépéseit *E. coli* mutánsainak vizsgálatával határozták meg, (Rajagopalan, 1996). A MoCo szerkezete az apoenzimhez való integrálódással egyidejűleg jön létre, melynek utolsó fázisát, a fématom megkötését a Cnx1 enzim katalizálja. A szerkezetvizsgálatok kimutatták, hogy a kofaktor mélyen az enzimfehérje belsejében helyezkedik el, és a pteringyűrű a fématom oxidációszám változásával részt vesz az elektrontranszportban. Ha a holoenzimről a MoCo-t felszabadítják, a Mo atom ledisszociál róla és irreverzibilisen elveszti katalitikus tulajdonságát. A Mo atom önmagában és a Mo nélküli enzim is inaktív. A Mo-antagonisták (pl. wolfram) kompetitív gátolják a Mo beépülését, inaktiválják az enzimet (Schwarz et al., 1998).

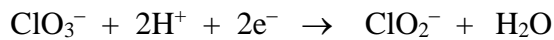
Bebizonyosodott, hogy a MoCo több redoxi enzimnek is – nitrát reduktáz, xantin dehidrogenáz, aldehid oxidáz, szulfít oxidáz – is fő funkcionális egységét alkotja. A koenzim fellelhető az élővilág teljes vertikumában, hasonló szerkezettel és ugyanolyan hatásmechanizmussal (Mendel, 1997).

1.2.3. A nitrát asszimiláció vizsgálata mutáns egyedeken

Az anyagcserefolyamatok az adott biokémiai reakcióra és szubsztrátra specifikus enzimek működése által ellenőrzöttek és szabályozottak. Egy-egy anyagcserefolyamat mechanizmusa a részfolyamatait katalizáló enzimek működése és azok szintéziséért felelős gének hatása révén vizsgálható.

Egyéb anyagcserefolyamatokhoz hasonlóan a nitrát asszimiláció tanulmányozása is a természetes populációból szelektált mutánsok, vagy mesterségesen előállított gének bevitelével létrehozott transzgenikus növények analízisével történik. A vad típustól eltérő egyedek élettani sajátosságainak megváltozása és a hozzákapcsolható genetikai módosulások összefüggése utal az élettani funkció genetikai hátterére. A nitrát asszimiláció mutánsaiban a nitrát felvétele és/vagy redukciója gátolt. Ezek a mutáns növényegyedek nitrogénforrásként nitrátot hasznosítani nem képesek, csak a nitrogén egyéb redukált formáinak (ammónia, aminosavak) jelenléte mellett életképesek.

A nitrát asszimiláció mutánsai rezisztensek klorátra is. A nitrátreduktáz a nitrát klór analógiát a klorátot a nitráthoz hasonlóan redukálni képes:



A képződött reakciótermék a klorit, mely a növényi szövetekre nézve toxikus (Aberg, 1947). Jelenléte a gyökérnövekedés gátlását valamint a levelek sárgulását – fehéresedését (etiolálódását), majd elhalását okozza (Labrie et al., 1991), ezért a klorát az agrotechnikában széles spektrumú herbicidként használatos.

A klorát toxikus hatása nemcsak a növényvédelemben előnyös, hanem hatékony módszere a nitrátredukcióban hiányos mutánsok szelekciójának. Klorátrezisztens mutánsokat baktériumokból (Qesada et al., 1994), gombákból (Unkles et al., 1991) és növényekből egyaránt izoláltak (Tsay et al., 1993). A nitrát asszimiláció enzimjeinek defektusa esetében a klorát vagy be sem tud jutni a sejt belsejébe, vagy nem képes klorittá redukálódni. Így klorát kezelés hatására a mutáns egyedek túlélők lesznek. A vad típusú egyedeken a klorát toxikus hatása megemelt nitrát koncentrációval visszaszorítható (Doddema et al., 1978). Ez is igazolja azt a feltételezést, hogy a két anion ugyanazon enzimrendszer működésére hat, egymásnak szubsztrátanalógiái. A kloráttoxicitás feltételei és helye szorosan összefügg a sejtek nitrátredukáló képességével, a nitrátredukció és a klorátredukció mechanizmusa megegyezik.

A nitrát asszimiláció vizsgálatára nitrát auxotróf vagy klorát rezisztens mutánsok alkalmasak. A nitrát auxotrófok, nitrát hasznosító képességük hiányában, egyedüli nitrogénforrásként nitrátot tartalmazó tápanyagon csíráztatva kifehéredett kotiledont növesztenek, mely alapján kiszelektálhatóak (Pelsy és Gonneau, 1991), majd ammónium tartalmú táptalajon felnevelhetők. A klorát rezisztensek a klorát stresszt túlélő egyedekként izolálhatóak.

1.2.3.1. Nitrát transzport mutánsok

A magasabbrendű növények közül elsőként az *Arabidopsis thaliana*-ból izoláltak a nitrát asszimilációban deficiens mutánst (Oostinder-Braaksma és Feenstra, 1973). A mutáns (*chl1*) klorátrezisztensnek bizonyult és nitrátfelvétele csökkent, ahogy a külső nitrátkoncentráció meghaladta az 1 mM-t. *Arabidopsis thaliana*-ból T-DNS inszercióval klónozott *Chl1* gént, *Xenopus oocytes*-ben vizsgáltak (Tsay et al.

1993). A kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a transzporter nem befolyásolja a nitrát kis koncentráció melletti felvételét (<1mM), és a működés hiányában a klorát nagy koncentráció mellett (>1mM) sem okozott toxikus tüneteket. Megállapították, hogy *Chl1* gén egy nitrát által indukálható, kis affinitású nitrát transzportert kódol, melynek aktivitása az extracelluláris tér savasságának növelésével nitrát jelenlétében és távollétében egyaránt fokozódik. Ez alapján feltételezik egy indukálható LATS létezését is (Daniel-Vedele et.al. 1998), amelynek működését ammónia represszálja (Huang et al., 1996).

1.2.3.2. Nitrátreduktáz mutánsok

A NR mutánsokat a magasabbrendű növények közül többek között *Nicotiana*-ban, *Hordeum*-ban és *Arabidopsis*-ban vizsgálták (Hoff et al.1994). A mutánsokat attól függően, hogy a fehérjeszerkezetet kódoló génekben vagy a MoCo bioszintézis génjeiben hibásak két osztályba sorolták. Az osztályba tartozás a mutáns xantindehidrogenáz (XDH) – mint szintén MoCo tartalmú enzim – aktivitása alapján dől el. Azokat a mutánsokat, amelyek egyidejűleg elvesztették a NR és a XDH aktivitásukat a kofaktorhiányos mutánsok (*cnx* mutáns) közé sorolták, mivel nem képesek a MoCo bioszintézisére vagy működtetésére. Azok a mutánsok, amelyek rendelkeznek a vad típusnak megfelelő XDH aktivitással, de NR aktivitásuk alacsony vagy nincs, mivel a polipeptidlánc szintézisében mutatnak rendellenességet, az apoenzim hiányos mutánsok (*nia* mutáns) közé tartoznak.

A MoCo bioszintézisének tanulmányozását növénymutánsok megfigyelésével és genetikai analízisével végezték. A *Nicotiana* nemzetség egyedeiben a *cnxA* mutáns vizsgálata alapján úgy találták, hogy a NR és XDH aktivitás részben visszaállítható a fiziológiásnál nagyságrendekkel nagyobb Mo koncentrációval. Ebből arra következtettek, hogy a *cnxA* mutáns hibája a Mo hiányából ered, míg a kofaktor MPT részének felépítése rendeltetészerű. Ezek alapján megállapították, hogy a *CnxA* lókuszt kódolja a Mo kofaktorhoz való kötődését. Ugyanakkor a *Cnx B* – *Cnx F* által kódolt enzimfehérjék a MPT szintéziséért felelősek (Mendel, 1992). A *cnx* mutánsok vizsgálata azt mutatta, hogy részleges NR aktivitással – NADH-citokrom c reduktáz – rendelkeznek, amelyhez a MoCo domén megléte nem szükséges. A *cnx* mutánsok széles körében találták meg a NR dimer formáit, ami alapján feltételezik, hogy a

MoCo nem felelős a két monomer összekapcsolásáért hanem annak stabilizálásában és a proteínázokkal szembeni védelemben lehet inkább szerepe (Steven et al., 1989; Marion-Poll et al., 1991).

A *cnx* mutánsok a molibdén kofaktor egyéb szerepével kapcsolatos funkciókban is hiányosak lehetnek. Árpa *cnx* mutánsánál számoltak be fokozott hőérzékenység miatti rendellenes hervadásról, ami az abszcizinsav bioszintézis hiányára utal. Ennek oka MoCo koenzim hiányában működésképtelen aldehid oxidáz lehet (Wallker-Simmons et al., 1989). Az *in vitro* nevelt *N. plumbaginifolia* *cnxA* mutánsok fejlődése során fellépő morfológiai abnormalitások (kis levélméret, hosszú internóduszok, klorotikus levelek) szintén az aldehid oxidáz MoCo hiányos csökkent működését jelzi, aminek következménye a nem megfelelő gibberellinsav/abszcizinsav arány (Gabard et al., 1988).

1.2.4. A nitrát asszimiláció szabályozása

A nitrát asszimiláció sokoldalúan szabályozott folyamat. A nitrátreduktáz (NR) és a nitritreduktáz (NiR) genom vagy cDNS klónjaik izolálása (Hoff et al., 1992; Vincenz et al., 1993), majd a nitráttranszporter (Nrt) génjeinek azonosítása (Tsay et al., 1993) lehetővé tették a nitrát metabolizmus szabályozásának molekuláris analízisét.

1.2.4.1. A nitrát felvételének szabályozása

A nitrát felvétele túlnyomó részt a HATS-on keresztül történik. Elsődleges induktora maga a nitrát (Doddema et al., 1978), amely már igen kis koncentrációban (0.18 μ M) is hatásosnak bizonyult (Samuelson et al., 1995). Ezzel szemben nagyon magas koncentrációban sincs negatív szabályozó hatással saját felvételére (Krapp et al., 1998). Azt találták, hogy a vakuólumok 100 mM koncentrációig telítődhetnek nitráttal, míg a citoplazma maximális nitrát koncentrációja 5 mM lehet (Miller és Smith, 1996.). Mutánsokon és transzgénikus növényeken vizsgálva is kimutatták (Ferrario et al., 1995; Scheible et al., 1997), hogy a magas nitrát tartalom nem gátolja a

felvételt, a sejten belüli nitrát mennyiség optimalizálása fokozott nitrát ürítéssel történik.

Árpa mutánsokban vizsgálták a nitrit, a klorát és a klorit nitrát transzportban betöltött szerepét (Siddiqi et al., 1992). A vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a nitrit a nitráthoz hasonlóan indukálja a Nrt működését de a nitráttal szemben nincs hatása a NR aktivitására. Ez alapján bebizonyosodott, hogy a nitrát transzportját és redukcióját két egymástól nemcsak működésükben, hanem szintézisükben is független enzim végzi. Ugyanakkor kimutatták, hogy a nitrit ugyanazon transzporter azonos kötőhelyéhez kapcsolódik, mint a nitrát, tehát a nitrát felvételének kompetitív inhibitora. Ezáltal nitrit toxikus koncentrációban való alkalmazásával nitrát transzport mutánsok szelekciójára van lehetőség, ha a NiR működése blokkolt.

A klorát, annak ellenére, hogy ugyanazon a szállítórendszeren keresztül jut be a sejtbe, mint a nitrát, majd szubsztrátjává válik a nitrátreduktáznak, mégsem indukálja sem a Nrt sem a NR működését (Siddiqi et al., 1992). A klorát hatására ugyan fokozódik a NR mRNS termelése, de a NR protein mennyisége és az enzimaktivitás nem nő (Labrie et al., 1991). Feltételezésük szerint a NR fehérje szintetizálódik, de a klorátból redukálódott klorit rövid időn belül inaktíválja azt.

Nitrát jelenlétében a klorát kis koncentrációban (< 1 mM) nem képes bejutni a sejtekbe. A koncentráció növelésével (> 5 mM) észlelhető a klorát toxikus hatása, ami azt mutatja, hogy a kis affinitású transzporterén keresztül történik a felvétele (Siddiqi et al., 1992). A klorátrezisztens mutánsok vizsgálata alapján látható, hogy ezek vagy NR-hiányosak, vagy a kis affinitású szállító rendszerük hibás. A nagy affinitású transzportban hiányt mutató mutánsok nem szelektálhatóak, mert annak hibája a kis affinitású transzporter normális és hatékony működése esetén nem detektálható. Ezért a klorátrezisztencia alapján kimutatható Nrt mutánsok vagy LATS-ban hiányosak vagy mindkét szállítórendszerük hibás.

A nitrát felvételét feed back gátlással elsősorban a glutamin szabályozza (Gojon et al., 1998). Több kutató számol be az ammónium gátló hatásáról (Siddiqi et al., 1990; King et al., 1993), bár nem kizárt, hogy végsősoron az inhibíció közvetlen okozója szintén az ammónia beépüléséből képződött glutamin volt. GOGAT hiányos mutánsokat magas glutamin koncentráción tartva, a nitrát koncentráció csökkenését figyelték meg *Arabidopsis* levelekben (Dzuibany et al., 1998), amiből a glutamin hatására bekövetkező nitrát felvétel inhibíciójára következtettek.

Arabidopsis thaliana NR hiányos mutánsokat vizsgálva kimutatták (Lejay et al., 1997), hogy a C–N anyagcsere komplexen visszahat a nitrát felvételére is. Szénhidrátok szintézisének csökken, annak hiányában pedig nő. Ennek megfelelően napi ciklikusságot mutat, és szaharóz bevitellel a sötét periódus nitrát felvétel gátlása megszüntethető.

1.2.4.2. A nitrát redukciójának szabályozása

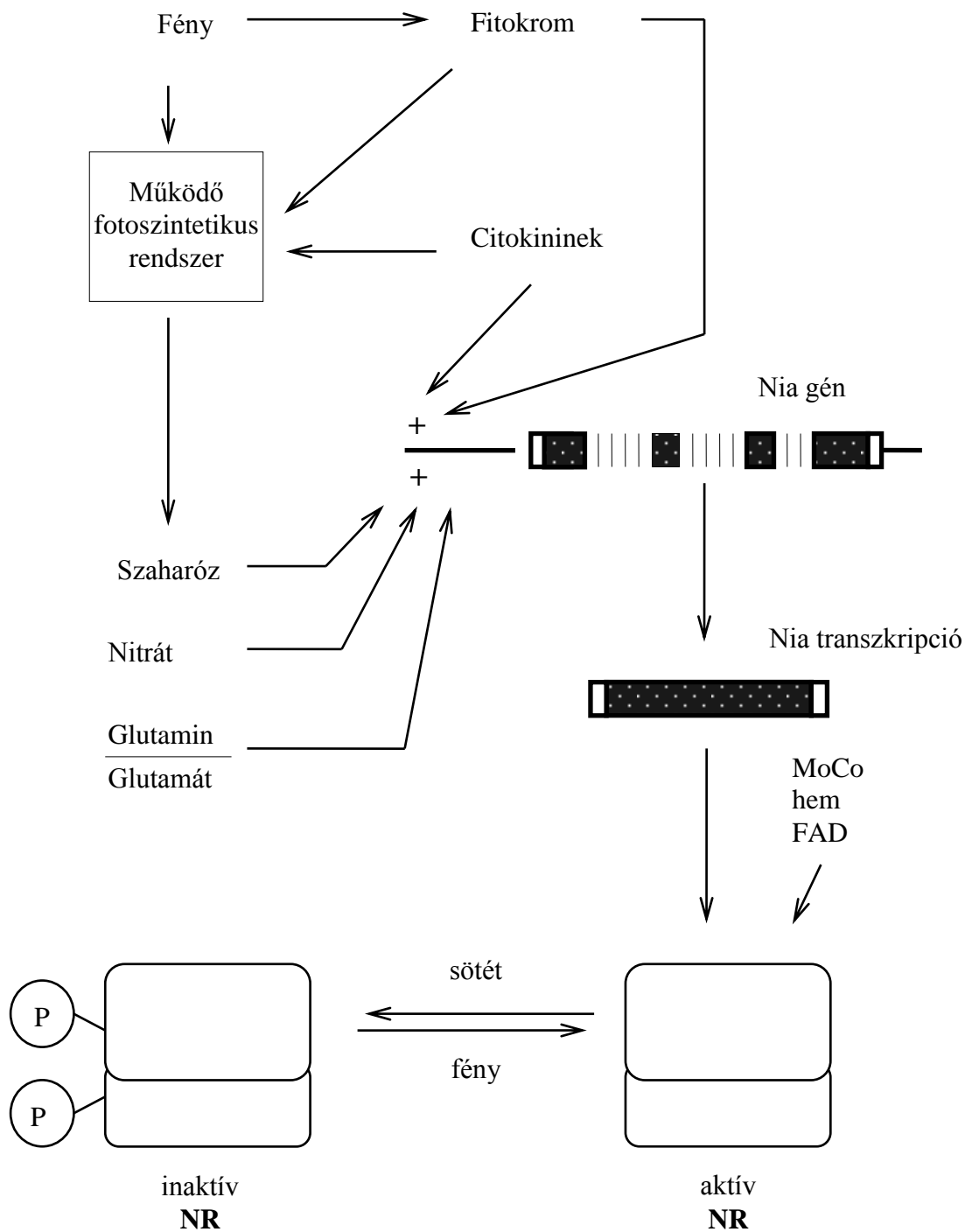
A nitrát redukciójának szabályozását transzkripciós és poszttranszlációs szinten vizsgálták. A nitrát, mint elsődleges aktívátor szerepe mellett serkentőleg hatnak még a fény, a szaharóz és egyéb szénhidrátok, valamint a citokininek. Represszorai nitrogén metabolitok, melyek közül a legnagyobb hatása a glutaminnak van. A szabályozás mechanizmusa és az azt befolyásoló effektorok hatása a 2. ábrán láthatók (Hoff et al., 1994).

1.2.4.2.1. Transzkripciós szabályozás

A nitrátreduktáz génszintű szabályozása többszörös ellenőrzésen keresztül valósul meg. A szabályozóanyagok egy része szerkezetileg vagy metabolikus kapcsolatban van az enzim szubsztrátjával, a nitráttal, vagy egyike a nitrátasszimiláció termékeinek; míg a többi általános szabályozója a NR-nak és más enzimeknek is. A NR gén indukciója nitráttal, citokininnel és fényel történhet, repressziója N-metabolitokkal, ezek közül is elsősorban glutaminnal.

1.2.4.2.1.1. Nitrátindukció

A nitrátreduktáz induktora az enzimtermelés szintjén maga az enzim szubsztrátja, a nitrát, amely a NR gén regulátor régiójában konstitutíven termelődő „nitrát-érzékeny” fehérje represszor szerepét függeszti fel (Campbell, 1999). Hatása már nagyon alacsony koncentráció mellett is megmutatkozik. Nitrátmentes tápközegben nevelt árpa gyökerében már 120 nmol g⁻¹ nitrát elégségesnek bizonyult a NR mRNS szintézisének beindításához (Tichner et al., 1993).



2. ábra. A NR *Nia* gén és az enzimaktivitás szabályozása

Transzkripció szinten a nitrát, a szaharóz, a citokininek és a fény pozitív, a glutamin és glutamátnegatív szabályozású. Az enzimfehérje szintézist követi a proszтетikus csoportok beépülése. Az enzimaktivitás fény által, foszforilezással szabályozott.
(Hoff et al. 1994. nyomán)

Nitrát hatására a NR aktivitás egy kb. 15-45 perces lag fázis után kezd el növekedni. Ez a közel lineáris növekedés 180-400 percig tart, miután a "steady state" szinten állandósul. Nitrátmentes táptalajon a "steady state" állapotnak megfelelő szint rohamosan csökken. Az enzimaktivitás lineáris növekedése a transzkripció és transláció inhibitorok hatására is megszűnik, majd lecseng (Srivastava és Shankar, 1996).

RNS izolálással, Northern hibridizációval, valamint cDNS izolálással és hibridizációval nagyszámú növény-modellrendszert vizsgáltak és bebizonyították, hogy a fokozott nitrátfelvétel gyorsan növeli a NR mRNS szintézisét. Így tökben (*Cucurbita maxima*) a nitrát hatására megnövekedett apoprotein szintézis a mRNS fokozott szintézisének következménye (Crawford, 1995). Árpában nitrátmentes közegen tartott csíranövényeket nitráttartalmú táptalajra téve a NR mRNS szintje alig pár órán belül a gyökérzetben és a hajtásban egyaránt a nulláról magas értékre emelkedett (Lillo, 1991).

A nitrát különbözően hat az egyes izoenzimekre. Szójában vizsgálva a nitrát bevitele nem hat a NAD(P)H:NR aktivitásra, de indukálja a NADH:NR képződést (Streit et al., 1987). Mindemellett árpában azt tapasztalták, hogy a NADH:NR és a NAD(P)H:NR mRNS szintje egyaránt megnőtt a nitráttal történő kezelést követő 30 perc után a gyökérzetben és a levelekben is. A nitrát kiürülése mindkét mRNS szint és mindkét izoenzim aktivitásának csökkenését eredményezi. Ez azt mutatja, hogy szabályozásuk egyazon operon által ellenőrzött.

Nagyszámú *Nicotiana plumbaginifolia nia* mutánsal végzett kísérlet alapján bebizonyosodott, hogy a nitrát minden esetben növeli a *Nia* mRNS szintet (Pilgrim et al., 1993). Az a tény, hogy a *nia* mutánsok széles köre – ui. a NR különböző doménjeiben eltérők – megőrizte nitrát indukciós képességét, bizonyítja, hogy a NR-nek nincs közvetlen szerepe saját szabályozására. Ez különbözik a gombák és a moszatok esetében tapasztaltaktól, melyek között sok olyan NR-hiányos mutánst találtak, amelyek nitrát hiányában konstitutív *Nia* mRNS szintézist folytattak, azaz a NR saját termelődését önmaga szabályozza (Hawker et al., 1992).

1.2.4.2.1.2. Szabályozás N-metabolitokkal

Sok *nia* és *cnx* mutánsban a *Nia* mRNS fokozott termelődését figyelték meg (Labrie et al., 1992). Nitrit redukáz hiányos növényeken – árpa *nir1* mutánsa (Ducanson et al., 1993) és transzgenikus *N. tabacum* (Vaucheret et al., 1989) – is

mRNS túltermelést és NRA túlműködést tapasztaltak. Az eredmények alapján arra következtettek, hogy az enzimműködés hiánya miatt nem képződik az a metabolit, amely a vad típusú egyedeken gátolja a *Nia* gén működését. A mutáns növényekben minden bizonnyal ennek, a nitrát redukciójából származó, nitritből képződő metabolitnak a hiánya okozza a fokozott *Nia* mRNS szintézist és emelkedett NR aktivitást. Dohány levelekben a glutamin szintetáz enzim inaktiválásával végzett kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy a glutamin az a metabolit, amely represszál és hiánya a *Nia* mRNS fokozott felhalmozódását okozza (Deng et al., 1991). A mutáns és a transzgenikus növény esetében is glutamin bevitelével a NR aktivitás és a mRNS szint nagymértékű csökkenését tapasztalták, mely igazolja a glutamin represszor szerepét (Vaucheret et al., 1997; Foyer et al., 1993).

A NR aktivitásának glutamin bevitelével történő fokozott gátlását sok növényfaj esetében tanulmányozták. Az inhibíció transzkripciós szintű szabályozását szója (Callaci és Smarelli, 1991), dohány (Deng et al., 1991; Vincentz et al., 1993), kukorica (Long et al., 1992) és spenót (Shiraishi et al., 1992) sejt kultúráiban történt vizsgálatok eredményei bizonyítják. Kukorica csíranövényeknél figyelték meg, hogy gyökérzetükben a nitrát redukcióját a glutamin nagyobb mértékben gátolja, mint a hajtásukban (Long et al., 1992). Ennek oka, hogy az elsődlegesen gyökérben előforduló NAD(P)H:NR érzékenyebb a glutamin gátló hatására, mint a NADH:NR. Mindezek ellenére minimális glutaminszint mellett a mRNS túltermelése a gyökérben és a hajtásban majdnem egyenlő mértékű volt.

1.2.4.2.1.3. Szabályozás citokininekkel

A citokininokról kimutatták, hogy növelik a NR aktivitást etiolált növényekben, így például árpa, búza és dohány sejt szuszpenziós kultúrájában (Gaudinova, 1990). A NR aktivitás növekedésének mértéke függ a növényfajtól valamint a citokinin koncentrációjától és minőségétől. A nitráthoz hasonlóan a citokinin szintén transzkripciós szinten hatnak (Lu et al., 1992). Indukáló hatásuk általában nagyobb nitrát jelenlétében, mint hiányában, habár a két indukáló anyag egymással nem szinergista.

Az abszcizinsav (ABA) csökkenti a NR gén megnyilvánulását árpában, mely részlegesen visszaállítható volt ugyanolyan koncentrációjú benziladenin (BA) adásával (Lu et al., 1992). Ebből következik, hogy az abszcizinsav szintén transzkripciós szinten hat és a NR mRNS szintet a BA – ABA viszonya szabja meg.

A legtöbb növényfaj esetében fény jelenléte szükséges a NR mRNS indukáló hormonális hatás számottevő megnyilvánulásához. Benziladeninnel kezelt etiolált árpa levelekben a megvilágítást követő 5 percen belül kimutatható különbséget észleltek a sötétben kezelt mintához képest. Úgy vélik, hogy a fény az endogén hormonszint megemelésén keresztül közvetve fejt ki a hatását (Lu et al., 1992).

1.2.4.2.1.4. A fény és a cukrok szabályozó hatása

A fényen nevelt növények szerveiből kivont enzim többszörös aktivitással rendelkezik, mint a sötétben neveltekből származó (Crawford et al., 1992). A fény hatására bekövetkező pozitív szabályozás a nem fotoszintetikus szervekben is megfigyelhető, mint a gyökérzetben, az endospermiumban és a szkutellumban (Srivastava and Shankar, 1996). A legtöbb növénynél a fény hatása transzkripció szinten jelentkezik, bár a transzkripciót követő enzimfehérje kémia módosításában is megnyilvánul (McKintosh, 1992).

Ha etiolált vagy sötétbe adaptálódott növényeket fényre helyeztek a *Nia* mRNS képződés indukcióját tapasztalták (Becker et al., 1992; Mohr et al., 1992). Öt napos kukorica csíranövényt vizsgálva a *Nia* mRNS szintje a megvilágítást követő egy órán belül 4-szeresre növekedett (Lillo, 1991). Ezzel megegyezően, több napon át sötétben tartott növények *Nia* mRNS szintje a minimálisra csökkent (Deng et al., 1991).

Perilla leveleiben kimutatták, hogy a NR indukálása fény hatására csak CO₂ jelenlétében zajlik; a CO₂ fotoszintetikus fixálása (Calvin ciklus) szükséges a magas szintű NR aktivitáshoz. A *Nia* mRNS gén indukciója nyilvánvalóan CO₂ fixálás termékeinek közvetítésével valósul meg. Azt tapasztalták, hogy a szaharóz és a glükóz helyettesítheti a fény hatását a mRNS indukációjában, ahogy arról *Arabidopsis* (Cheng et al., 1991) és dohány (Vincentz et al., 1993) esetében is beszámoltak. Mindkét kísérletben arra a következtetésre jutottak, hogy a fény enzimaktivitást stimuláló hatása a fotoszintézis által végbemenő szénhidrát bioszintézis révén érvényesül. A *Nia* mRNS fény indukciója nyilvánvalóan a CO₂ fixálás során képződött intermedier termékek közvetítésével valósul meg. Ezt igazolják azok a megfigyelések, amelyek révén kimutatták, hogy a fruktózzal szemben a ribóznak és a mannitnak nincs a *Nia* mRNS képződésére szabályozó hatása. A cukor transzkripció szintű induló hatását dohány *Nia1* promoterhez kapcsolt GUS szaharóz indukálta megnyilvánulásával igazolták (Cheng et al., 1991).

1.2.4.2.1.5. A napi ritmus szabályozó hatása

A magasabbrendű növényekben a fotoperiódus korai szakaszában a NR aktivitás, a fehérje és mRNS szint magas, majd annak végén, a nap végéig fokozatosan csökken. A természetes napi fotoperiódusban fejlődött növények *Nia* mRNS szintje jelentős ingadozást mutat a nappali-éjszakai ciklusban, mely a napfelkeltét követő órákban mutat maximális emelkedést (Galangau et al., 1988; Cheng et al., 1991; Deng et al., 1991; Pilgrim et al., 1993). Ez az ingadozás kihat a NR mennyiségének és aktivitásának a változására is. A levelekben és hajtásokban tapasztalt ilyen változásokkal szemben a növények gyökérzetében nem figyelhető meg a NR aktivitás napi ingadozása (Deng et al., 1991).

A ciklikus ingadozás megmutatkozik a transzkripciót gátló glutamin mennyiségének változásában is; ugyanis a glutamintartalmak feltöltődése és kiürülése a glutamin gátló hatása miatt a *Nia* mRNS szint váltakozásával ellentétes fázisban történik (Deng et al., 1991). Míg *N. plumbaginifolia* esetében a mRNS napi ciklikus változása transzkripciós szabályozás alá esik (Vincentz és Caboche, 1991), addig az *Arabidopsis thaliana* poszttranszkripciós szabályozással valósítja azt meg (Pilgrim et al., 1993).

1.2.4.2.2. Poszttranszlációs szabályozás

A NR aktivitása számos szabályozó faktor hatására pár perc alatt minimálisra csökken. Ez arra utal, hogy a gátló hatás nem génszinten az enzimfehérje szintézisének folyamatában jelentkezik, hanem a működőképes biokatalizátor olyan módosításával, amely aktivitásának elvesztésével jár. Ezt mutatja az a tény, hogy az enzimaktivitás rohamos csökkenése mellett a fehérjetartalom és a *Nia* mRNS szintje változatlan. Így spenót leveleiben vizsgálva a NR aktivitás mindössze 2 perces sötét kezelés hatására a kontroll minta aktivitásának a 15%-ára csökkent, (Bachmann et al., 1996). Hasonló megfigyelésre jutottak, amikor az NR-t kódoló gént CaMV 35S promóterrel dohányba transzformálták; a NR fehérje szintje 72 órás sötét inkubációt követően az 1/4 -ére esett vissza, de a NR mRNS szint nem csökkent (Vincentz és Caboche, 1991). Nussaume és munkatársai (1995) olyan nitrátreduktáz mutánsokat vizsgáltak, amelyek MoCo domén előtti régiójából 56 aminosav hiányzott. Azt tapasztalták, hogy fény hiányában a NR szint még 72 óra múltán sem csökkent. Mindezeknek a kutatási

eredményeknek az alapján arra lehet következtetni, hogy a gyors enzimaktivitás csökkenés miatt a szabályozás az enzimfehérje poszttranszlációs módosítása révén történik, melyben az enzim harmadlagos szerkezete, az N-terminális rész aminosav szekvenciája és a fény hatása egyaránt érvényesül.

Kaiser és munkatársai (1994) kiderítették, hogy a NR poszttranszlációs szabályozása a fehérje foszforilezése/defoszforilezése révén történik. Fény hiányában a levelek NR fehérjéjéhez ATP közvetítésével Mg^{2+} jelenlétében foszfát csoport kapcsolódik, mely az enzim aktivitás reverzibilis gátlását okozza (McKintosh, 1992). A NR aktiválása fényben 2A protein foszfatáz katalizálta defoszforilezéssel megy végbe. Pontmutáció segítségével meghatározták a foszforilálás pontos helyét, aminek az 1. proteáz hasító hely szomszédságában lévő Ser534 oldallánca bizonyult (Su et al., 1996).

In vitro körülmények között foszforilációval nem sikerült gátolni megtisztított NR működését (Huber et al., 1994). A tisztítási művelet más frakciói inaktiválták a NR-t, amikor azokat az aktív NR tartalmú frakcióval újból összekeverték. Kimutatták, hogy a gátlást egy fehérje okozza. Bebizonyították, hogy a Ser oldallánchoz kapcsolódó foszfát egy inhibitor fehérje megkötődését indukálja, ami 14-3-3 proteinnek bizonyult (Bachmann et al., 1996.). A fehérje, amely a hem – MoCo közötti elektronátmenetet gátolja, Mg^{2+} függő.

A protein kináz katalizálta reverzibilis foszforiláció gyorsan végbemenő szabályozó folyamat. Jelentősége elsősorban annak tudható be, hogy a nitrát redukció gátlásával képes megakadályozni a toxikus nitrit akkumulációját abban az esetben, ha a redukált ferredoxin – a NO_2^- elektrondonorja – alacsony szinten van, és ezért gátolt a nitrit ammóniává történő további redukciója.

A nitrátreduktáz enzim hatásmechanizmusa és a működését szabályozó folyamatok széleskörűen tanulmányozottak, és több növényi modellen ismertek. Munkánkhoz az *in vitro* kutatásokban nehezebb tenyésztetősége miatt csak ritkábban használt, de gazdasági szerepét tekintve annál nagyobb jelentőségű növényfajt, a búzát választottuk. Egyrészt tanulmányoztuk a nitrát asszimilációját szabályozó számos tényező hatását, másrészt idegen gén bevitelével, a nitrát metabolizmussal összefüggésben is, vizsgáltuk a transzgenikus növények tulajdonságait és a genetikai transzformáció lehetőségét.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Növényanyag

Növényanyagként a mexikói szárazasú CIMMYT No.45 tavaszi búzát választottuk. 44 búzafajta éretlen embrióból indított sejtenyészetének regenerációs képességét összehasonlítva, a kalluszk növekedése, valamint a sejtek embrió- és organogenezise tekintetében ez a fajta bizonyult az *in vitro* tenyésztésre a legalkalmasabbnak (Felföldi és Purnhauser, 1992). A regenerált sejtekből származó vonal CY 45 jelölést kapott, az *in vitro* kutatási munkák modellnövényeként ezzel a névvel szerepel. A géntranszformációt megelőző kísérletsor alapján is úgy találtuk, hogy egyéb vizsgált *in vitro* tenyésztésre jelöltekkel (GK Délibáb, GK Góbé és GK Kunság) összehasonlítva, a szövettenyésztethetőség tulajdonságait tekintve, ez a genotípus bizonyult a legmegfelelőbbnek.

2.2. A nitrát asszimiláció vizsgálata

2.2.1. Hidropóniás növénynevelés

A hidropóniás növényneveléshez a növények magjait felszínterilezést (2% NaO'Cl-ben folyamatos 20 perces rázással) követően Petri-csészében, nedves szűrőpapírok között, sötét helyen, 3 napon át csíráztattuk. A kicsírázott magok, amelyek 3-5 mm hosszúságú főgyökér kezdeménnyel rendelkeztek, Erlenmeyer-lombikból kialakított hidropóniás nevelőedényekbe kerültek. A csíranövények 2 napig csapvizet nőttek, majd nevelő tápoldatra raktuk őket. A tápoldat pH-ját foszfát pufferrel (K-Pi) 5,5-re állítottuk be, makroelem összetételét, az 1. táblázat mutatja. Mikroelemekből és Fe-EDTA-ból a MS táptalaj makroelemeit (ld. szövettenyésztő táptalajok) tartalmazta 2/3-os töménységben. A tápoldat nitrátmentes volt, egyrészt a vélhetőleg NR hiányos növényegyedek felnevelhetősége, másrészt a nitrát indukciós hatásának vizsgálata miatt. Az alacsony pH a nitrát felvétel fokozása céljából került

alkalmazásra. A növények 4 napig nőttek a nitrátmentes nevelő tápoldaton. Ezt követően a kontroll növények ezen az oldaton fejlődtek tovább, a többi egyed pedig 24 órára 0,4 mM illetve 2,0 mM KNO₃- t tartalmazó indukáló oldatra raktuk. Az indukáló oldat makroelem összetételét úgy terveztük, hogy a nevelő tápoldat ion összetételével megközelítőleg azonos legyen (ld. 1. táblázat).

1.táblázat. A hidropóniás nevelő és indukáló tápoldat makroelem összetétele

Összetevők	nevelő	indukáló	Összetevők	nevelő	indukáló
	mM	mM		mM	mM
KNO ₃ *	—	0,4	CaCl ₂ x2H ₂ O	3	3
KNO ₃ *	—	2	MgSO ₄ x7H ₂ O	2	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	—	KCl	2	—
K-Pi (pH: 5,5)	2	2	Na ₂ SO ₄	—	1

*Két különböző indukáló oldatban külön-külön.

A növényeket ellenőrzött körülmények között, 25°C hőmérsékleten 16/8 órás fotoperiódus mellett fluoreszcens, hideg fényt alkalmazva neveltük fel. A fenti módon felnevelt növényeket használtuk a nitrát felvétel és redukció szabályozásának vizsgálatához, valamint a vélhetőleg NR transzgenikus egyedek klorát rezisztencia alapú minősítésére.

2.2.2. A nitrát redukció szabályozása

A klorát és a glutamin hatásának vizsgálatához a 24 órán keresztül kétféle nitrát indukcióban részesült vizsgálati növényeket különböző klorát és glutamin tartalmú tápoldatokra helyeztük. A tápoldatok az indukációs oldatok összetevőin kívül 1, 3, 5, 7, 10 és 15 mM KClO₃-t, valamint 0,5 és 3,0 mM Gln-t tartalmaztak külön-külön, illetve a hatóanyagok 2. táblázat szerinti kombinációiban.

A sötét kezelés vizsgálatához a növényeket 48 órán keresztül sötét helyen tartottuk. A kallusz eredetű minták korai embrió eredetű kalluszok 2. átpasszálást követő kéthetes tenyésztéseiből származnak

2.táblázat. A klorát és a glutamin kezelés tápoldatainak hatóanyag összetétele

KNO ₃	KClO ₃	Glutamin	KNO ₃	KClO ₃	Glutamin
mM	mM	mM	mM	mM	mM
0,4	—	—	2,0	—	—
0,4	1	—	2,0	5	—
0,4	3	—	2,0	7	—
0,4	5	—	2,0	10	—
0,4	7	—	2,0	15	—
0,4	—	0,5	2,0	—	0,5
0,4	—	3,0	2,0	—	3,0
0,4	7	3,0	2,0	7	3,0

A kezelések hatását a nitrát felvételére 24 óra elteltével, a NR aktivitásban mutatkozó különbségeket, és a növények fejlődésében beállt változásokat pedig a 8. napon értékeltük és minősítettük. A tápoldatokat 3 naponta frissekre cseréltük, a párolgásból és felhasználásból adódó térfogatcsökkenést pedig naponta pótoltuk.

2.2.3. A nitrát felvétel mérése

A nitrát felvételére a hidropóniás tápfolyadék nitrát koncentrációjának csökkenéséből következtettünk. Ehhez a folyamatosan légárammal cirkuláltatott tápoldatból a kezeléseket követő 1 nap elteltével vettünk mintát, melynek NO₃⁻ koncentrációját ionszelektív elektróddal határoztuk meg. A mérés ezüstklorid referencia elektróddal szemben történt, értékeit KNO₃ kalibrációs oldat segítségével számoltuk. A nitrát felvételét a tápoldat nitrát tartalmának csökkenéséből számítottuk és 1g növényanyagra vonatkoztattuk.

2.2.4. Nitrátreduktáz aktivitás meghatározás *in vivo*

A nitrát, a klorát és a glutamin hatását a NR aktivitásra *in vivo* mértük. A mérési módszer anaerob körülmények között, friss növényi szövetből extrahált NR aktivitás függvényében képződött nitrit mennyiségének spektrofotometriás meghatározásán alapszik (Ferrari et al., 1973). A mérést kéthetes növények 2. leveleivel végeztük a következők szerint:

1. A növények levelét lemetszettük, és 2-5 mm-es darabokra vágva 100-120 mg-ot félkémcsőbe mértük.
2. A mintákra apró üveggolyókat tettünk, majd 3 ml, előzetesen inert gázzal (N₂) alaposan átmosott extraháló oldatot – 2.5 % etanol (v/v), 1mM EDTA és 8,3 % (v/v) 0,2 M K-foszát puffer (pH:7,5) – rétegeztünk alájuk.
3. Az félkémcsöveket vákuum exikkátorba raktuk, 3 percig vákuummal kiszívtuk a levegőt, majd N₂-vel kiegyenlítettük a nyomást.
4. A mintákat 2 órán keresztül 25°C-on sötétben nitrogén atmoszférában inkubáltuk.
5. Az inkubációs idő lejártával a mintákat alaposan összekevertük (vortex), majd 10 percre forrásban lévő vízfürdőbe tettük.
7. Szobahőmérsékletre hűtést követően a mintákhoz 75 µl 0,25 mM-os fenazin-metaszulfátot (PMS) adtunk, majd 15 percig sötét helyen inkubáltunk.
8. A sötét kezelés után 300 µl 1 w/v %-os szulfanilamidot (1 N HCl-ban oldva) és 300 µl 0,02 w/v %-os 1-naftil-etiléndiamid-hidrokloridot (NED) adtunk a reakcióelegyhez, majd további 30 perces sötét inkubáció következett.
9. A mintákat 15 ezer ford./percen 5 percig centrifugáltuk.
10. A küvettákba öntött minták felülúszóit $\lambda = 540$ nm-en spektrofotométeren mértük.

2.2.5. Az enzimkinetikai állandók meghatározása

A hidropóniás körülmények között nevelt 7 napos csiranövények a 24 órás nitrát indukció után a kontroll, kezeletlen növénycsoport mellett 3 és 7 mM ClO₃⁻ kezelésben részesültek. A kezelést követő 8. nap után a növények 2. leveléből mértük a

NRA-t *in vivo*. A mérési módszer extrakciós fázisát követően 5 különböző szubsztrát koncentráció (0,125; 0,167; 0,25; 0,5 és 1,0 mM NO₃⁻) mellett határoztuk meg a NRA értékeket.

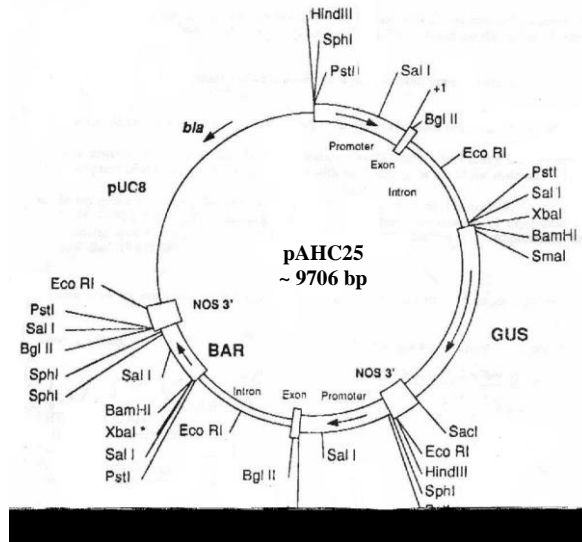
2.3. Transzgénikus búza előállítása

2.3.1. *In vitro* növénynevelés

A búza donor növények üvegházban kerültek felnevelésre, és a kalászokat virágzás után 11-12 nappal gyűjtöttük be izolálásra. Az éretlen szemeket 2% NaO'Cl és 1 ml/l Tween csapvizes oldatával sterileztük rázógépen 20 percig, melyet többszöri steril desztillált vizes öblítés követett. Az izolálást steril körülmények között, sztereomikroszkóp alatt MS-D₂ sejtindukciós táptalajra végeztük (Sears és Decker, 1982; Purnhauser, és Gyulai 1993). A táptalaj Murashige-Skoog (MS) alaptáptalaj (Murashige és Skoog, 1962) mellett hormonként 2 mg/l 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D) tartalmazott. A 6.-10. napra kifejlődő kalluszokat négy hetes ciklusokban ötször passzáltuk. A hormontartalmat az első átrakást követő további szaporítások alkalmával 1 mg/l-re csökkentettük le. A ciklus végén a kalluszokat MS_{zizi} táptalajon regeneráltuk, amely az alaptáptalaj valamennyi komponense mellett 1-1 mg/l zeatint (ZEA) és indolecetsavat (IES) tartalmazott. A táptalajok pH-ját 5.7-re állítottuk be. Szilárdító közegnek Phytigel 2.5 g/l dózisát használtuk. A növények gyökereztetése 0,1 mg/ml indolecetsavas MS táptalajon történt.

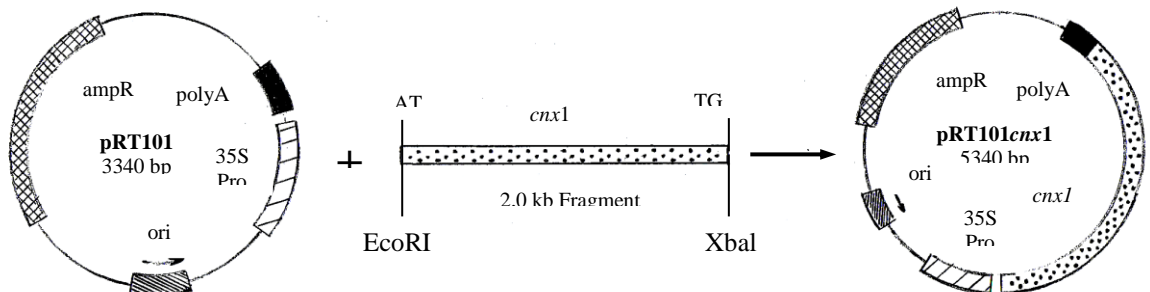
A *bar* transzgénre 5 mg/ml bialaphos koncentrációjú tápoldattal szelektáltunk. A vélhetően NR transzgénikus egyedek felnevelésére nitrátmentes, a nitrogént aminosavak formájában biztosító AA (Thompson et al., 1986) táptalajt használtunk, amely a sejt dedifferenciálódáshoz 2,4-D mellett 0,2 mg/l kinetin (KIN) és 0,1 mg/l gibberellinsav (GA₃) hormonokat is tartalmazott. A MS és az AA táptalaj összetételét a 3. táblázat mutatja.

A *gus* rész *Escherichia coli*-ből származik, a *bar-t* *Streptomyces hygroscopicus*-ből izolálják, az *Ubi-1* promóter kukorica eredetű. A plazmidot *Escherichia coli*-ban klónozták, majd izolálták és tisztították. A pAHC25 plazmid géntérképét a 4. ábra mutatja.

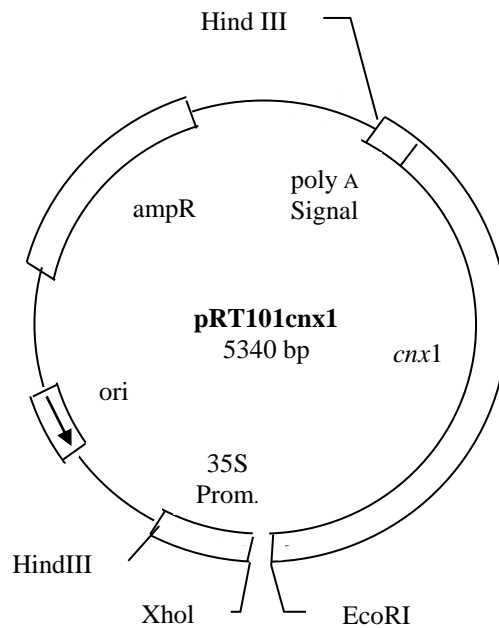


4. ábra. A pAHC25 plazmid géntérképe

A másik vektor a pRT101 plazmidból alkották meg, és a NR *cnx1* gént antiszenz formációban tartalmazza. A géneket a CaMV 35S promóter hajtja meg. A *cnx1* gén *Arabidopsis thaliana* eredetű. A *cnx1* régió beépítését a pRT101 plazmidba az 5. ábra, a pRT101*cnx1* géntérképét a 6. ábra mutatja.



5. ábra A *cnx1* régió beépítése a pRT101 plazmidba.



6 ábra. A pRT101cnx1 géntérképe.

A plazmidokat a Braunschweigi Műszaki Egyetem Botanika Tanszéke állította elő és bocsátotta a rendelkezésünkre.

2.3.3.2. Génbevétel

Az idegen gének beviteléhez a tenyésztő edényként használt Petri-csészék (ø 40 mm) területének középső kétharmadába 50-50 embriót izoláltunk. A kalluszokat sötét termosztátban, 28°C-on, 2mg/ml 2,4-D hormonnal kiegészített MS táptalajon indukáltuk. A belövéshez 1-25 napos kalluszokat használtunk.

A plazmidot hordozó mikrorészecske a Heraeus cég typ. 200-04 aranypor készítménye volt. A mikrorészecskék tisztítását és a DNS felvitelt az alábbiak szerint végeztük (Sanford Laboratory, 1991):

1. Eppendorf csőben 400 µl 70%-os etanolban 12 mg Heraeus aranyport 20 másodpercig felkevertük (vortex), majd 10 percig állni hagytuk.
2. 2000 ford./perc sebességgel fél percig centrifugáltunk, majd a felülúszót eldobtuk.
3. 200 µl steril desztillált vízben mostuk az arany részecskéket, majd 10 percig állni hagytuk.

4. A 2. pont szerint centrifugáltunk
5. A megtisztított aranyrészecskéket 200 µl jégen hűtött 50%-os glicerinben vettük fel és ultrahanggal egyenletesen eloszlattuk. Az arany szuszpenziót a DNS felviteléig jégen tartottuk.
6. Óvatos keverés közben 20 µg plazmid DNS-t adtunk az előbbieken elkészített szuszpenzióhoz.
7. Pipettaheggyel történő keverés közben 200 µl jégen tartott 2,5 M CaCl₂, majd 80 µl hideg 0.1 M spermidin oldatot adtunk a szuszpenzióhoz, mely ezután 10 percig jégen állt.
8. 10 másodpercig 1000 ford/perc fordulattal centrifugáltunk a DNS-sel bevont arany szemcséket, majd a felülúszót eldobtuk.
9. Óvatos rázás közben 200 µl 70%-os etanolt adtunk a preparátumhoz.
10. A 3. pont szerint centrifugáltunk, majd a szuszpenzió óvatos keverése közben a preparátumot 200 µl jégen tartott abszolút alkoholban vettük fel.
11. . Az egyenletes szuszpenziót 9 µl-es cseppekben helyeztük az alkohollal sterilizált hordozó korongokra.

A fenti módon eljárva, 20-21 db a géntranszformációra megfelelően előkészített, beszárított korongot kaptunk, melyekkel az éretlen embrió eredetű mikrokalluszokat az elkészítést követően azonnal belőttünk.

A plazmidok bejuttatása a PDS-1000/He DuPont részecskebelövő berendezéssel történt. A PDS-1000 héliumgázzal hajtott részecskebelövő berendezés üzemeltetése során a felhasználói utasításnak megfelelően jártunk el. A munkatérben 27 Hgmm vákuumot alkalmaztunk. A héliumot 1200-1300 psi nyomásnál engedték be a plazmidokat hordozó részecskék borította korong fölötti térbe. A vákuum és nyomás hatására szétrepedő műanyag korong és a belőtt kalluszok közötti távolságot 12 cm-re állítottuk be, melyet a legkedvezőbb tranziens expressziós mintázat alapján választottunk meg.

2.3.3.3. *In vitro* szelekció

A DNS-sel belőtt tenyészeteket 2-3 nappal a belövést követően átraktuk 3 mg/l bialaphost tartalmazó (steril szűrlet) 2 mg/ml 2,4-D tartalmú AA táptalajra. Tenyésztésüket sötétben, 28°C-on inkubálva termosztátszekrényben végeztük. A

szelektív körülmények között túlnövő kalluszokat a tenyésztés 6.-8. hetében továbbpasszáztuk, amit öt hetes ciklusokban négyszer megismételtünk. A szelekciós ciklus végére a táptalaj bialaphos tartalmát a második passzálástól 5 mg/l-re emeltük, és a 2,4-D tartalmát 1 mg/l-re csökkentettük. A szelekciós ciklus végén a kalluszok növényregeneráció céljából AA_{zizi} táptalajra kerültek. A regenerálás során szelekciós nyomást már nem alkalmaztunk.

2.3.2. A transzformáció ellenőrzése

2.3.2.1. β -glükuronidáz enzim teszt

A génbelövés hatékonyságát a GUS enzim katalizálta, β -glükuronid hidrolitikus bontásának detektálásával, Jefferson (1987) festési módszere alapján ellenőriztük. A sejtkolóniákra 1 ml reakcióelegyet pipettáztunk, amely 1,2 mg szubsztrátot, 20 μ l DMSO-t, 940 μ l GUS puffert (50 mM foszfátpuffer, pH: 7,5 + 10 mM EDTA + 0,1 % Triton + 0,4 % Sacrosyl) és 40 μ l β -merkeptoetanolt tartalmazott. A mintákat 2 órán keresztül 28°C-on inkubáltuk, majd a megfestett kolóniák elhelyezkedése és száma alapján kiértékeltek.

2.3.2.2. Foszfinotricin-acetiltranszferáz enzim teszt

A szelekciós markerként *Streptomyces hygroscopicus* mikroorganizmusból izolált *bar* gén a foszfinotricin-acetiltranszferáz (PAT) enzimet kódolja. Az enzim acetilálja és ezáltal inaktiválja a totális gyomirtószerként használt hatóanyagot, a foszfinotricint (PPT).

A PAT enzim tesztet kalluszból ill. zöld levélmintából készítettük az alábbi protokoll szerint (Spencer, 1990):

1. 100 mg súlyú friss mintát jégen tartott Eppendorf csőbe gyűjtöttünk.
2. A mintát 200 μ l extrakciós pufferben kézi dörzsöléssel homogenizáltunk és feltártunk.

3. A növényextraktumot 13 ezer ford./percen, 5 percig tartó centrifugálással választottuk el.
4. 50 mM Ac-Koenzim-A és radioaktív PTC 1:1 elegyéből mintánként 2 µl-t Eppendorf reakciócsövekbe tettünk.
5. A centrifugált mintából 20 µl felülúszót adtunk a reakciócsőbe.
6. 1 óra inkubálás következett 30°C-os hőblokkban, lassú rázás mellett.
7. A reakciót 10 µl 12% TCA-val az 1 órát követően leállítottuk.
8. A 3. pont szerint centrifugáltunk.
9. A mintát Merck cellulózlemezre vittük fel, amit szárítás követett.
10. A futtatás egy éjszakán át 25 ml piridin-, 37,5 ml 1-butanol-, 7,5 ml sósav- és 30 ml H₂O-elegyében történt.
11. A teszt eredményét Kodak X-OMAT filmre exponáltuk, amelyet hagyományos módon hívtunk elő.

2.3.2.3. Nitrátreduktáz aktivitás meghatározás *in vitro*

A nitrátreduktáz aktivitás *in vitro* meghatározása kinetikai módszerrel, a képződött nitrit fotométeres detektálása alapján történt (Pawelczyk, 1993). Az enzimreakció lefutása során az 5. a 10. és a 15. percben történt a mintavétel és a nitrittartalom mérés. A mérést kalluszokból és növényekből végeztük. A mérést megelőzően a NR aktivitás indukálása céljából a növényanyagot 48 óráig 15 mM KNO₃ oldattal kezeltük, majd homogén mintát vettünk. A mintákat dörzsoszárban, folyékony nitrogénes hűtőközegben porrá dörzsöltük, és 100-120 mg-t a NR meghatározásához kimértünk. A kimért mintákat felhasználásig Eppendorf csövekben -70°C-on tároltuk. A NR aktivitás mérését az alábbiak szerint végeztük:

1. Az enzimreakció leállításához a mintavevő Eppendorf csövekbe 25 µl 0,6 M-os cinkacetát oldatot mértünk ki.
2. A 25°C-ra beállított hőblokkba előkészített Eppendorf csövekbe az enzimreakció közegeként 775 µl mintapuffert és 15 µl levéladditívet tettünk.
3. A 0 perces (vak minta) és a kontroll mintavevő csövekhez 235-235 µl mintapuffert és 15-15 µl levéladditívet adtunk. A kontroll minta pufferja nitritet is tartalmazott, ami 0,01 µM nak felelt meg.

4. A mintákat jégen tartva mindegyikhez négyszeres mennyiségű extrakciós puffert adtunk majd jól összekevertük (vortex).
5. A 0 perces és a kontroll minta 50-50 µl extraktumát a mintavevő csövekbe adtuk.
6. A hőblokkban levő csövekbe fél perces időközönként 165 µl minta extraktumot mértünk, jól összekevertük (vortex) majd 3 alkalommal 10 percenként (10., 20. és 30. perces minták) 300-300 µl mintát vettünk.
7. A mintavétel után alaposan összekevert mintákhoz 75 µl 0,25 mM-os fenazin-metaszulfátot (PMS) adtunk, és a mintákat 15 percig sötét helyen inkubáltuk.
8. A sötét kezelés után 300 µl 1 w/v %-os szulfanilamidot (1 N HCl-ban oldva) és 300 µl 0,02 w/v %-os 1-naftil-etiléndiamid-hidrokloridot (NED) adtunk a reakcióelegyhez, majd további 30 perces sötét inkubáció következett.
9. A mintákat 15 ezer ford./percen 5 percig centrifugáltuk.
10. A küvettákba öntött minták felülúszóit $\lambda = 540$ nm-en spektrofotométeren mértük

2.3.3. A növények felnevelése és vizsgálata

2.3.3.1. Az in vitro növényállomány felnevelése

A steril körülmények között jól gyökeresedett növénykéket fitotron kamrában neveltük tovább. A növényeket normál talajba ültettük, majd egy hétig fóliával takartuk, és magas páratartalmat biztosítottunk a számukra.

A foszfinotricin rezisztencia vizsgálata céljából végzett herbicides kezelés bialaphos 0,1 %-os oldatával történt. A kereskedelmi forgalomban bialaphos (82% PPT) néven ismert hatóanyagot a japán Meiji Seika Kaisha cég szíves ajándékként használtuk kísérleteinkhez. A négy-hat hetes korú növényeket a reggeli órákban permeteztük. A hatóanyagra érzékeny egyedeken a klorotikus tünetek a kezelést követő 3.-4. napon jelentkeztek, a növények teljes elszáradása pedig két hét után következett be. A kisselektált, rezisztens állomány üvegházi továbbnevelésre került.

2.3.3.2. Az utódnemzedékek felnevelése és in vivo szelekciója bar génre.

Az *in vitro* eredetű, edzett és foszfinotricin rezisztenciára szelektált növények (T_0 nemzedék) agyagcserepekbe (\varnothing 20 cm) normál talajba lettek ültetve, majd üvegházba kerültek, ahol a búza környezeti igényeinek megfelelő klímát biztosítottuk a számukra. Az idegentermékenyülés megakadályozására a növények kalászait a virágzás előtt celofánzacskóval szigeteltük.

A fertilis egyedek utódait (T_1 nemzedék) növénynevelő ládáknban, üvegházi körülmények között neveltük tovább. A herbicid rezisztencia teszt elvégzéséhez 15% (w/v) glufozinát-ammónium hatóanyag-tartalmú Finale 14 SL (AgrEvo) totális gyomirtó szert alkalmaztunk 0,5%-os (v/v) töménységben. A vetés utáni 25. napon öt leveles állapotban hajtottuk végre a növények herbicides kezelését. A gyomirtó szer egyenletes kijuttatását kézi permetezővel a reggeli órákban végeztük.

2.3.3.3. A nitrátreduktáz enzim hatóképességének vizsgálata klorát tesztel

A kloráttal szembeni rezisztencia vizsgálatához a növényeket hidropóniás termesztési körülmények között neveltük fel (ld. *Hidropóniás növénynevelés*). Az egy hetes 3 leveles állapotú csíranövények tápoldatát 50 mM-os $KClO_3$ oldattal 7 mM klorát koncentrációjúra egészítettük ki. A klorátos tápoldatot két naponként frissre cseréltük. A klorotikus tünetek az érzékeny egyedeken a 3.- 4. napon kezdtek megjelenni. A klorátos kezelés 10. napján vált – a tünetegyüttes széles spektruma miatt – megbízhatóan értékelhetővé a kísérlet eredménye. Ekkor végeztük a kiértékelést.

3. EREDMÉNYEK

Ahhoz, hogy idegen gén beépüléseként a nitrátreduktáz enzim működésében beálló változásokat a megfelelő módon elemezni tudjuk, először az enzim jellemzésére, valamint a hatását befolyásoló tényezők tanulmányozására és megismerésére volt szükség. Ennek érdekében a transzformációs kísérletek modellnövényén a CY-45 búza genotípuson vizsgáltuk a NR szabályozásáért felelős faktorok hatását, melyekről úgy gondoltuk, hogy a NR-hiányos transzformáns növények minősítésénél fontos szerepük lehet.

A nitrát komplex hatása miatt vizsgáltuk a teljes asszimilációs folyamatban betöltött szerepét, ami felvételére és redukciójára egyaránt kiterjedt. A NR enzimkinetikai jellemzése mellett a glutamin gátló és a klorát toxikus hatását tanulmányoztuk, valamint a fény és a napi fotoperiodicitás szabályozó szerepe volt még vizsgálatunk tárgya.

Ezt követően került sor a géntranszformációs kísérletsorra, melyben a génbevitel technikai paramétereit riporter gén (*gus*) működtetésével optimalizáltuk, a kotranszformált vektorok integrálódását marker génnel (*bar*) igazoltuk, és tanulmányoztuk a bevitt „hasznos” idegen gén (*cnx1*) megnyilvánulásának hatásfokát.

3.1. A nitrát asszimiláció vizsgálata

3.1.1. A nitrát felvétele

A nitrát felvételét hidropóniás körülmények között nevelt egyhetes csíranövényeken vizsgáltuk. A kezeléseket (nitrát, klorát és glutamin) követő 24 óra után a hidropóniás tápoldat nitrát koncentráció csökkenéséből következtettünk a felvett nitrát mennyiségére. Az eredményeket a 4. táblázat mutatja, statisztikai értékelésük a 5. táblázatban látható

4. táblázat. A nitrát a klorát és a glutamin hatása a nitrát felvételére 1 hetes csíranövényben

Mintaszám	Kezelés mM			Nitrát felvétel	
	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	Gln	μmol × g ⁻¹ × h ⁻¹	%
1	0,4	—	—	28,7 ± 2,3	100
2	0,4	1	—	27,6 ± 2,1	96
3	0,4	3	—	27,3 ± 2,4	95
4	0,4	5	—	26,1 ± 2,0	91
5	0,4	7	—	25,5 ± 1,8	89
6	0,4	—	0,5	27,0 ± 2,2	94
7	0,4	—	3,0	14,3 ± 1,3	50
8	0,4	7	3,0	14,6 ± 1,1	51
9	2,0	—	—	37,5 ± 3,0	100
10	2,0	5	—	27,4 ± 1,9	73
11	2,0	7	—	24,0 ± 1,7	64
12	2,0	—	0,5	36,7 ± 2,9	98
13	2,0	—	3,0	17,4 ± 1,6	46
14	2,0	7	3,0	16,3 ± 1,3	43

A mérési adatok 2 ismétlésben 3-3 növényminta átlagát ± SD reprezentálják (n = 6).

A %-os értékek a csak nitrát kezelésben részesült mintákra vonatkoztatottak, külön-külön az alacsonyabb és a magasabb koncentrációt illetően.

A nitrát koncentráció növelésével annak felvétele nem egyenesen arányos (ld. 1. és 9. sz. minta). Az alacsonyabb koncentrációban (0,4 mM) adott nitrát felvételére a klorát jelentős hatást nem gyakorolt (ld. 1., 2., 3., 4., és 5. sz. minta), a nagyobb koncentráció (2,0 mM) mellett viszont a növekvő klorát koncentráció fokozott hatása figyelhető meg (ld. 9., 10. és 11. sz. minta). Ebből következik, hogy ugyanaz a klorát koncentráció viszonylagosan erősebb gátló hatást okoz a nagyobb nitrát koncentráció melletti nitrát felvételre, mint a kisebb koncentráció mellett (ld. 4. és 10., ill. 5. és 11. sz. minta). A glutamin az alkalmazott kisebb koncentrációban nem fejt ki

semmilyen hatást (ld. 6. és 12. sz. minta), míg a nagyobb koncentrációban a nitrát és a klorát környező mennyiségétől függetlenül megközelítőleg ugyanolyan mértékben gátolja a nitrát felvételét (ld. 7., 8., 13. és 14. sz. minta).

5. táblázat. A nitrát, a klorát és a glutamin nitrát felvételére gyakorolt hatásának statisztikai értékelése.

Elemzett minták	t	Elemzett minták	t	Elemzett minták	t
1 – 2	0,452	1 – 6	0,837	9 – 12	0,557
1 – 3	1,634	1 – 7	4,873	9 – 13	4,367
1 – 4	2,365	1 – 8	4,963	9 – 14	4,358
1 – 5	2,782	6 – 7	4,738	12 – 13	3,962
2 – 3	0,163	6 – 8	4,657	12 – 14	4,143
2 – 4	1,594	7 – 8	0,237	13 – 14	0,448
2 – 5	2,037	9 – 10	3,636	6 – 12	3,435
3 – 4	0,428	9 – 11	3,887	7 – 13	2,727
3 – 5	1,762	10 – 11	2,931	8 – 14	0,634
4 – 5	0,967	n = 6	p = 0,05	t _{krit} = 2,228	

A minták statisztikai analízise azt mutatja, hogy a $P = 5\%$ szinten a klorát nitrát transzportot gátló hatása a nagyobb koncentrációk mellett (5 és 7 mM) szignifikáns, és ez a hatás a magasabb nitrát adag (2,0 mM) mellett kifejezettebb. A glutamin 0,2 mM koncentrációban nem befolyásolja a nitrát felvétel mértékét, a magasabb koncentrációban (3,0 mM) viszont szignifikánsan különbözik a kezeletlen és az alacsony Gln mintától egyaránt. A nitrát felvétel glutamin gátlása mellett a klorát még a legmagasabban alkalmazott koncentrációjában (7mM) sem okozott fokozott csökkenést. A két nitrát koncentráció hatásának összehasonlításában a magas klorát (7 mM) és glutamin (3,0 mM) együttes hatásaként nem tapasztalható szignifikáns különbség, az összes többi kezelésnél a nitrát felvétel szignifikáns különbséget mutat.

3.1.2. A nitrátreduktáz enzim szabályozása

Az enzim szabályozásában szerepet játszó faktorok közül a nitrát a klorát és a glutamin hatását, valamint a fény és a napi ciklus befolyását vizsgálatuk.

Mivel a NR hiányos növényegyedek csak nitrátmentes közegben képesek fennmaradni, és ezért az anyagcseréjükhöz szükséges nitrogént más forrásból – praktikusán az aminosav szintézis kiinduló vegyülete, a glutamin révén – kell biztosítani, a pRT101 *cnxI* antiszenz bevitelével nyerhető transzgénikus növények értékeléséhez fontos ismerni e két vegyület NR szabályozó hatását. A klorát mérgezés tünetei a NR hiánya vagy csökkent működése esetén nem, vagy kisebb mértékben jelentkeznek. A transzgénikus és a vad típusú egyedek közötti klorát érzékenység objektív értékelése céljából meg kellett tervezni a klorát kezelés hatékony módját a normál NR működést mutató populáción.

A fény és a napi ciklus NR aktivitást befolyásoló szerepének vizsgálatát a növénynevelési és a mintavételi körülmények ilyen szempontból is pontos beállításának feltételezett szükségessége és ennek megfelelő tervezése miatt véltük célszerűnek.

3.1.2.1. A nitrát, a klorát és a glutamin hatása

A nitrát, a klorát és a glutamin NR aktivitásra kifejtett hatását hidropóniás körülmények között nevelt 15 napos csíranövényeken vizsgáltuk. A vizsgálat eredményei a 6. táblázatban láthatóak.

NR aktivitás a nitrát huzamosabb megvonása mellett nem volt detektálható (ld. 17. sz. minta). A nitrát koncentráció növelése a NRA emelkedését váltotta ki (ld. 1. és 9. sz. minta). A növekvő klorát koncentráció arányosan csökkentette a NRA-t mindkét nitrát kezelés esetében (ld. 2., 3., 4. és 5., ill. 10., 11., 12. és 13. sz. minta). Ugyanolyan klorát kezelés hatására a NRA kisebb mértékben csökkent a nagyobb nitrát koncentráció mellett, mint a kisebb mellett (ld. 4. és 10., ill. 5. és 11. sz. minta). A glutamin az alkalmazott kisebb kezelés hatására is csökkentette a NRA-t, magasabb koncentrációja mellett az enzimaktivitás gátlása hatványozottan fokozódott (ld. 6., 7. és 8., ill. 14., 15. és 16. sz. minta). A klorát és a glutamin együttes alkalmazása a NRA gátlásában hatásuk összegződésében jut kifejezésre (ld. 8. és 16. sz. minta).

6. táblázat. Nitrát, klorát és glutamin kezelések NRA-ra kifejtett hatásai 15 napos csíranövényeken.

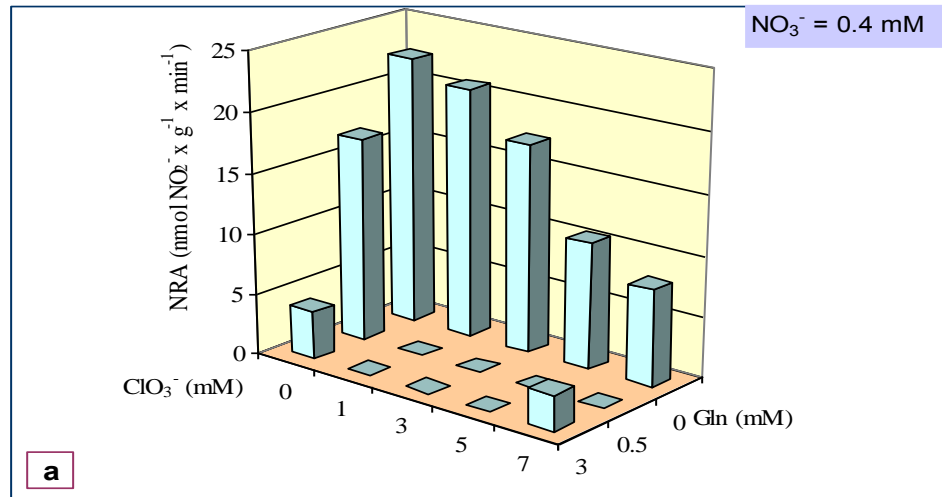
Mintaszám	Kezelés			Nitrátreduktáz aktivitás	
	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	Gln	nmol NO ₂ ⁻ × g ⁻¹ × min ⁻¹	%
1	0,4	—	—	22,3 ± 1,3	100
2	0,4	1	—	20,8 ± 1,4	93
3	0,4	3	—	17,4 ± 1,1	78
4	0,4	5	—	10,5 ± 0,8	47
5	0,4	7	—	8,0 ± 0,6	36
6	0,4	—	0,5	16,9 ± 1,2	76
7	0,4	—	3,0	4,0 ± 0,3	18
8	0,4	7	3,0	2,9 ± 0,3	13
9	2,0	—	—	30,4 ± 2,1	100
10	2,0	5	—	23,1 ± 1,6	76
11	2,0	7	—	20,7 ± 1,2	68
12	2,0	10	—	16,3 ± 1,2	54
13	2,0	15	—	12,7 ± 0,9	42
14	2,0	—	0,5	24,9 ± 1,7	82
15	2,0	—	3,0	7,8 ± 0,5	26
16	2,0	7	3,0	6,7 ± 0,4	22
17*	—	—	—	nem mérhető	

*A nitrátmentes tápoldatban nevelt kontroll

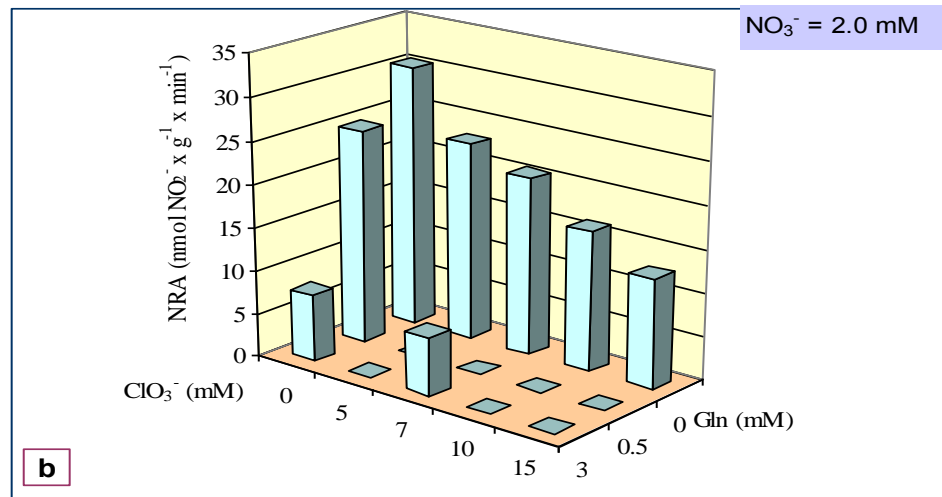
A mérési adatok 2 ismétlésben 3 –3 növény minta átlagát ± SD reprezentálják (n = 6).

A %-os értékek a csak nitrát kezelésben részesült mintákra vonatkoztatottak, külön-külön az alacsonyabb és a magasabb koncentrációt illetően.

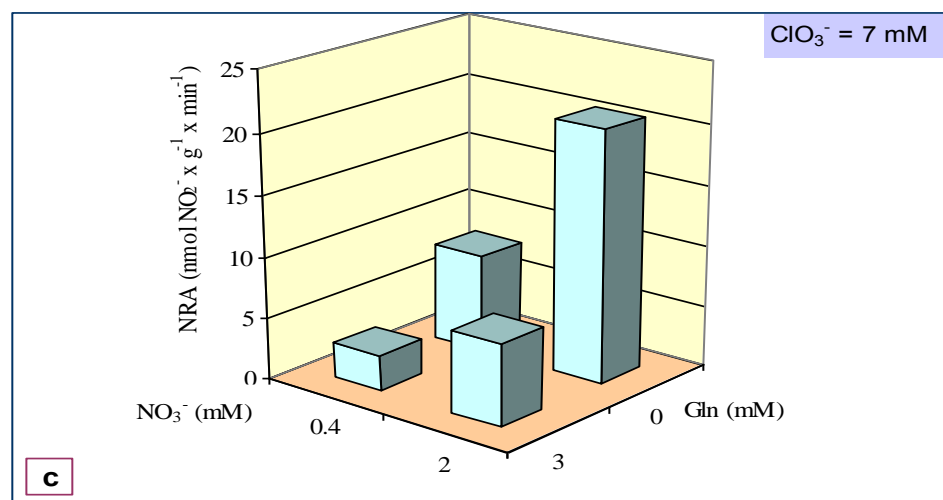
A klorát és a glutamin hatását a NRA-ra a 0,4 és a 2,0 mM nitrát koncentráció mellett külön-külön, valamint a 7 mM klorát melletti nitrát és glutamin hatást a 7. ábra oszlopdiagrammjai szemléltetik.



A ClO₃⁻ és a Gln hatása a NRA-ra 0,4 mM NO₃⁻ mellett (a)



A ClO₃⁻ és a Gln hatása a NRA-ra 2,0 mM NO₃⁻ mellett (b)



A NO₃⁻ és a ClO₃⁻ hatása a NRA-ra 7,0 mM ClO₃⁻ mellett (c)

7. ábra. A nitrát, a klorát és a glutamin hatása a NRA-ra

3.1.2.2. A fény és a napi ciklus hatása

A NR aktivitás különböző fény ellátottsági viszonyok melletti napi változásának ismerete a mintavétel optimális időpontjának meghatározása szempontjából szükséges.

A fény hatását és a fénykezelés napi időtartamának növekedését a NR aktivitásra kallusz és növény szinten vizsgáltuk. A vizsgálati minták egyik részét fénytől elzárt helyen tartottuk, a másik csoport 16/8 órás napi fény ciklusban részesült. A NRA méréseket 24 órás nitrát indukció előzte meg. A kísérletsor eredményeit a 7. táblázat mutatja.

7. táblázat. A fény és napi váltakozásának hatása a NRA-ra kallusz és növény szinten.

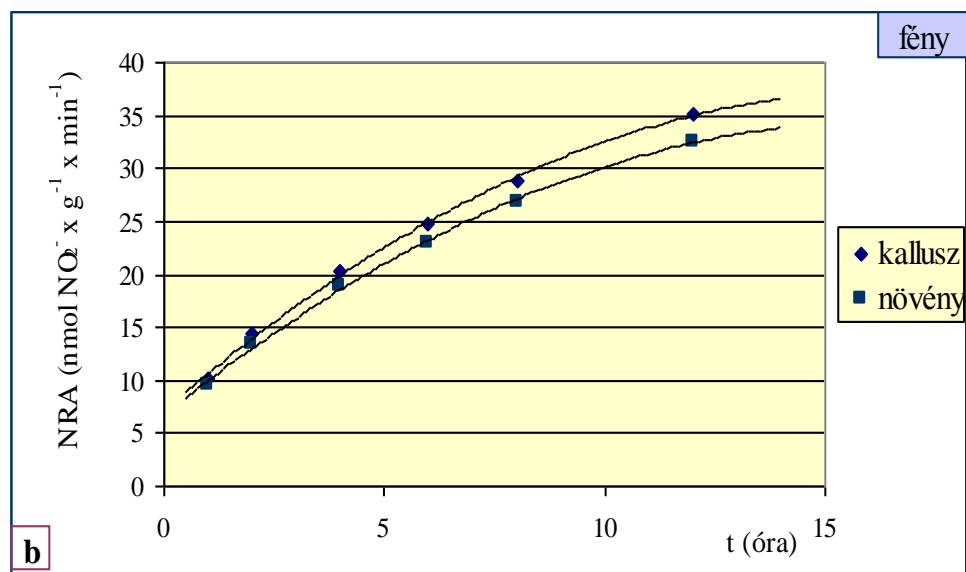
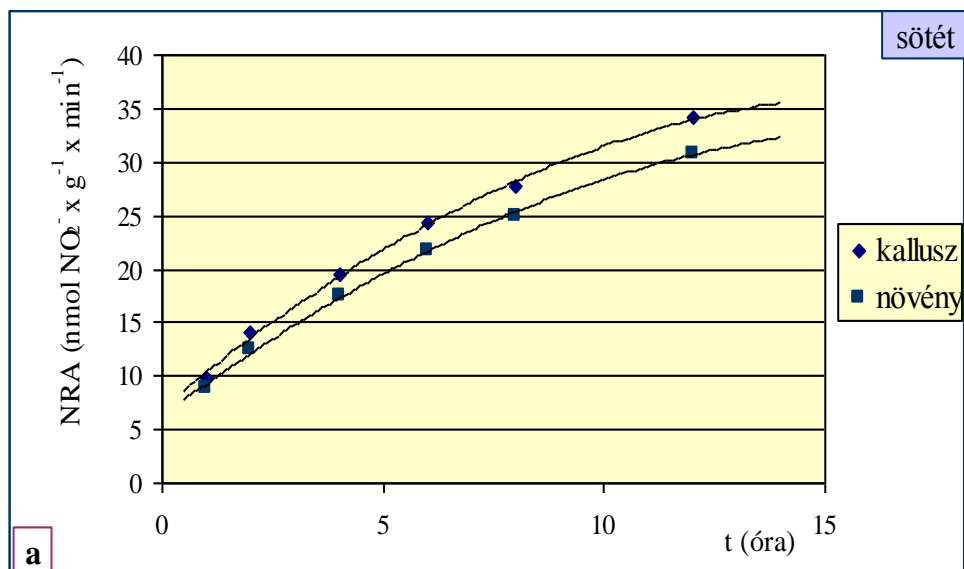
Időpont (óra)	Nitrátreduktáz aktivitás (nmol NO ₂ ⁻ × g ⁻¹ × min ⁻¹)			
	Sötét		Fény	
	kallusz	növény	kallusz	növény
1	9,9	8,9	10,1	9,6
2	14,0	12,4	14,4	13,3
4	19,5	17,5	20,3	18,9
6	24,3	21,7	24,7	23,0
8	27,7	24,9	28,9	26,9
12	34,1	30,8	35,1	32,5

*a megvilágítás kezdetét követő idő

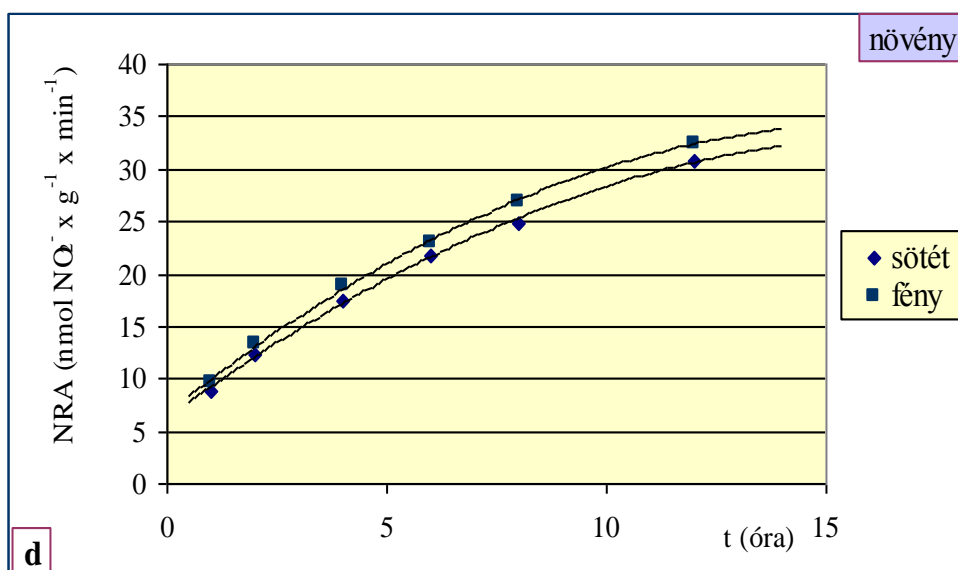
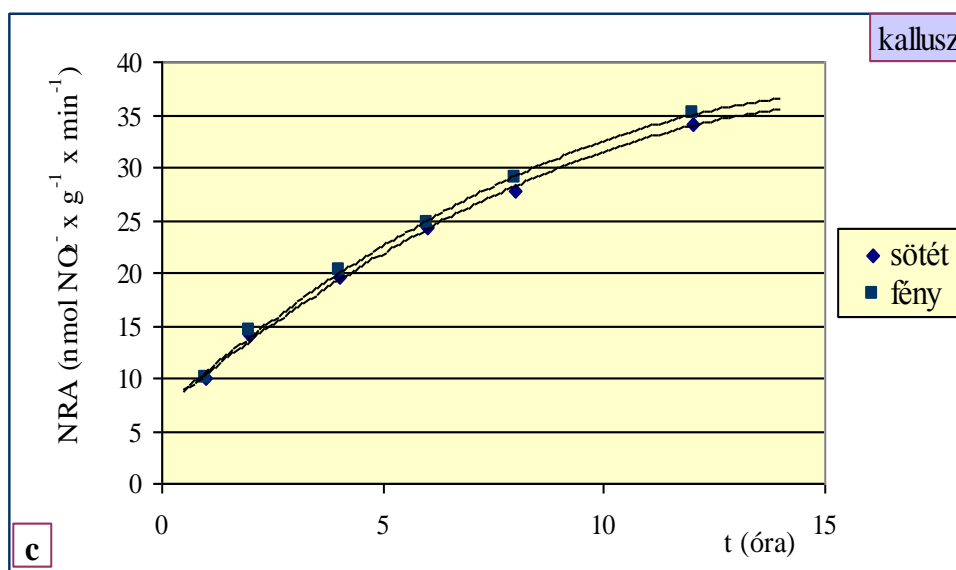
A mérési adatok 2 ismétlésben 3 –3 növény minta átlagát ± SD reprezentálják (n = 6).

A mérés eredményei azt mutatják, hogy a kétféle kezelés mind a négy kombinációjában a világos időszak előrehaladtával a NR aktivitás emelkedik, és a növekedés mértéke csökken.

Regressziós analízis alapján úgy találtuk, hogy a NRA = f (t_{napi}) függvénykapcsolat másodfokú polinommal jól illeszthető, mellyel megfelelően modellezhető a NR aktivitás növekedése a megvilágítás idejének függvényében. A négy kezelés hatását leíró függvénykapcsolat grafikus képe a 8. és 9. ábrán látható, matematikai leírását a 8. táblázat tartalmazza.



8 ábra. A napi ciklus változásának hatása a NRA-ra kallusz és növény mintákban:
sötétben kalluszban és növényben (a);
fényen kalluszban és növényben (b);



9. ábra. A napi ciklus változásának hatása a NRA-ra kallusz és növény mintákban:
 kalluszban sötétben és fényen (c);
 növényben sötétben és fényen (d);

8.táblázat. A NRA függése a megvilágítástól és a napi fényciklustól.

Kezelések		NRA = f (t _{napi})	r ²
Sötét	kallusz	$y = -0.1021 x^2 + 3.4692 x + 7.0133$	0.9979
	növény	$y = -0.0877 x^2 + 3.0845 x + 6.2747$	0.9984
Fény	kallusz	$y = -0.1089 x^2 + 3.6305 x + 7.0923$	0.9981
	növény	$y = -0.1020 x^2 + 3.3674 x + 6.6837$	0.9988

3.1.3. A nitrátreduktáz enzim kinetikai jellemzése

A nitrátreduktáz kinetikai vizsgálata során meghatároztuk az enzim kinetikai állandóit és elvégeztük a klorát gátlási típusának kinetikai elemzését. Az enzimreakció időbeni lefutásának tanulmányozásával megmértük a nitrát indukció hatását a NRA időbeni változására.

3.1.3.1. A kinetikai állandók meghatározása és a klorát gátlása

Öt különböző szubsztrát koncentráció mellett megmértük a NRA értékeket *in vivo*. A klorát gátlásának kinetikai jellemzésére ugyanolyan szubsztrát koncentrációk alkalmazásával mértük a két különböző koncentrációban adott klorát hatásaként megváltozott NRA értékeket. A mérés eredményei és a Lineweaver-Burk ábrázoláshoz számított $1/V_0 - 1/S$ értékpárok a 9. táblázatban láthatók.

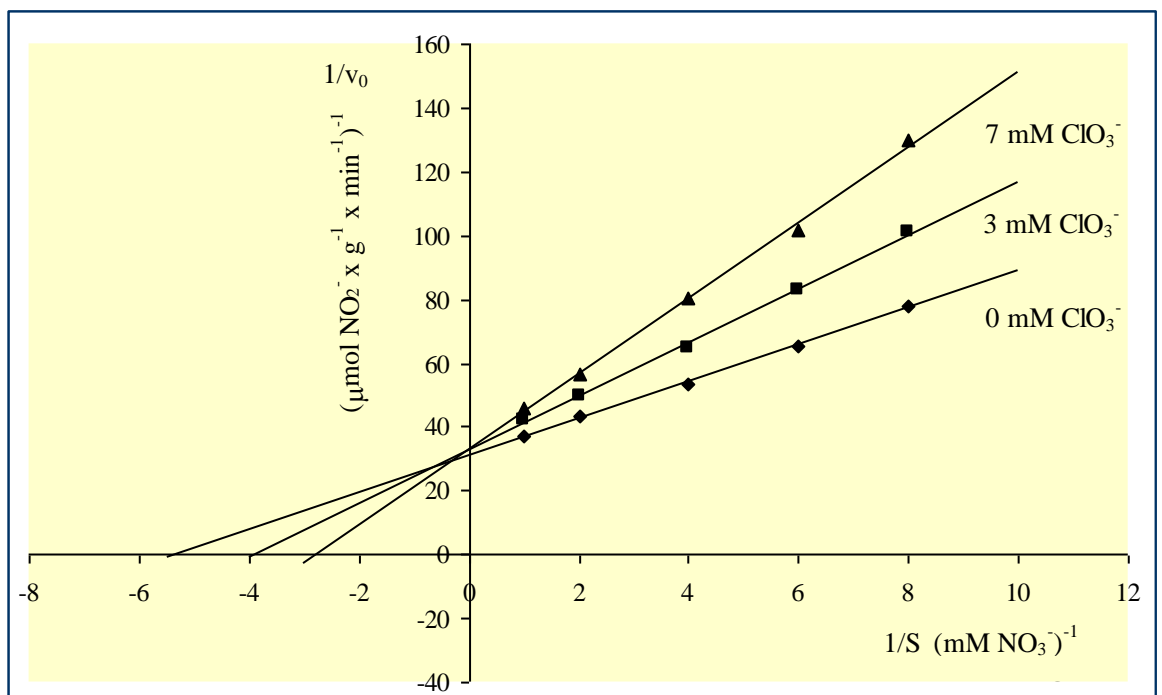
Kiszámítottuk a három kezelés hatását leíró matematikai függvényeket, és a Lineweaver-Burk grafikus módszerrel meghatároztuk a kinetikai állandók (V_{max} , K_m és K_i) értékeit (ld. 10 ábra. és 10. táblázat).

9. táblázat. A NRA értékei a szubsztrát koncentráció függvényében a kezeletlen, valamint a 3 és a 7 mM ClO_3^- kezelés mintáiban, a hozzátartozó $1/V_0 - 1/S$ számított értékpárokkal.

[ClO_3^-] (mM)		Nitrát koncentráció [NO_3^-] = [S] (mM)				
0		12,8	15,3	18,8	23,2	26,9
3	NRA*	9,9	12,1	15,3	20,0	23,9
7		7,7	9,8	12,4	17,6	21,8
	$1/[S]$ (mM^{-1})	8	6	4	2	1
0		78,1	65,4	53,2	43,1	37,2
3	$1/V_0^{**}$	101	82,6	64,5	49,5	42,4
7		130	102	80,6	56,8	45,9

*($\text{nmol NO}_2^- \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) **($\mu\text{mol NO}_2^- \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)⁻¹

A mérési adatok 3 párhuzamos mérés átlagát reprezentálják .



10. ábra. A NR reakciósebesség szubsztrát függése és gátlása 3,0 és 7,0 mM ClO_3^- kezeléssel Lineweaver-Burk ábrázolásban

10. táblázat. A NR és a két ClO_3^- gátlás enzimkinetikai jellemzői.

ClO_3^- (mM)	$1/V_0 = f(1/S)$	r^2	V_{\max}^*	K_m (μM)	K_i (mM)
0	$y = 5,793 x + 31,071$	0,9981	32	186	—
3	$y = 8,384 x + 32,787$	0,9972	30	256	7,97
7	$y = 11,879 x + 33,167$	0,9979	30	358	7,57

*($\text{nmol NO}_2^- \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)

A három egyenes y-tengelymetszete közel megegyező, a klorát egyik vizsgált koncentrációjában sincs hatással a V_{\max} értékére. Az x-tengelymetszet különbözősége a K_m értékek eltérését jelzi, melyekből kiszámítottuk K_i inhibíciós disszociációs egyensúlyi állandók értékeit.

3.1.3.2. Az enzimreakció időbeni lefutása

Korai embrió eredetű kalluszsöveten vizsgáltuk a nitrát indukció hatását a NR aktivitás időbeni változására, annak céljából, hogy az indukciót követő NRA mérés mintavételének a legmegfelelőbb időpontját megállapítsuk. A mérési sorozatot AA és MS táptalajon tenyésztett, kétszer átpasszált kéthetes kallusztenyészet 15 mM NO_3^- indukcióját követően végeztük. A mérés eredményeit a 11. táblázat mutatja.

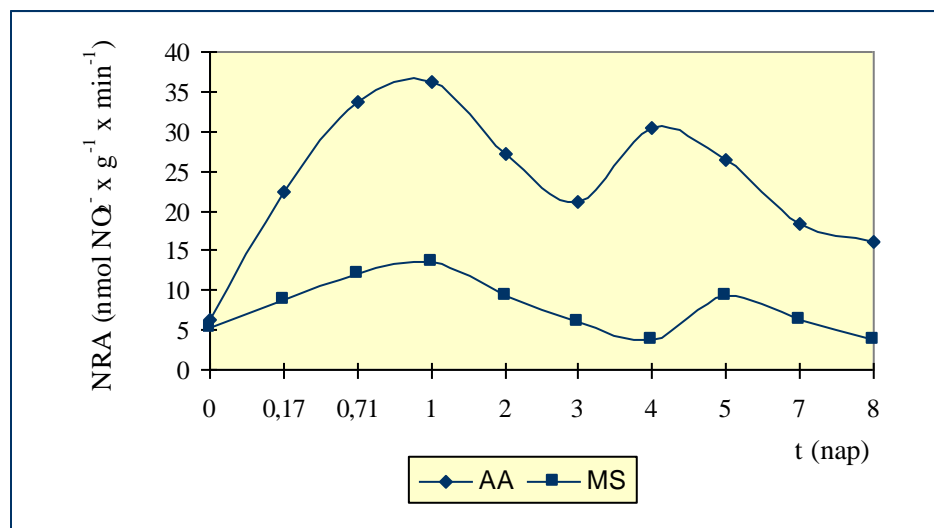
11. táblázat. A NRA 15 mM NO_3^- indukciót követő időlefutásban.

Időtartam (óra)		0	4	17	24	48
NRA*	AA	6,2	21,0	33,5	36,3	27,2
	MS	5,2	8,8	12,0	13,5	9,3
Időtartam (nap)		3	4	5	7	8
NRA*	AA	21,2	30,5	26,3	18,7	14,5
	MS	6,0	3,7	8,8	6,2	3,0

*($\text{nmol NO}_2^- \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)

A mérési eredmények 3 párhuzamos mérés adatait tükrözik

A mérési adatokból, valamint a $NRA = f(t)$ függvénykapcsolat ábrázolásával (ld. 11. ábra) látható, hogy a nitrátmentes táptalajon (AA) tenyésztett kalluszok válasza a nitrát indukcióra közel háromszoros NRA emelkedést eredményezett, mint a nitrátos táptalajon (MS) nevelteké. A függvénykapcsolatot leíró görbe két lokális maximummal rendelkezik. A MS táptalajon nevelkedett kallusz eredetű minták esetében laposabb és elnyúltabb, mint az AA táptalajról származókat jellemző görbe. Az enzimaktivitás mindkét esetben 24 óra elteltével éri el a maximumot. Ezt követően fokozatosan csökken, majd egy enyhébb emelkedő szakasz, a második maximum után – nitrátmentes táptalajon tenyésztettnél a 4. nap, a nitrátos táptalajon fejlődött esetében az 5.-6. nap között van ez a csúcs – a kiindulási értékhez tart.



11. ábra A NRA időgörbéje AA és MS táptalajokon tenyésztett kalluszsövetekben vizsgálva

3.1.4. A klorát toxikus tünetegyüttes, klorát teszt

A klorát külső jegyekben, a növényi szövetek fokozatos és folyamatos pusztulásában is megnyilvánuló hatása jól érzékelhető. A változások a kísérleti paraméterek célszerű megválasztásával időben elhúzódhatnak, ami a nem nagy

különbőségű hatásokra jelentkező tünetegyüttesek közötti kisebb különbségek alapos megfigyelését teszi lehetővé. A nitrátreduktáz aktivitásban levő különbségek a klorát toxicitás különbségeiben is megnyilvánulnak, aminek objektív megítélésével a NR hatására lehet következtetni. Annak érdekében, hogy klorotikus tünetek alapján a NR működés mértékére tudjunk következtetni, megvizsgáltuk és a tünetegyüttes alapján jellemeztük a növényeken külső jegyekben megnyilvánuló változásokat. A megfigyelés kiterjedt a háromleveles állapotot elért csíranövények mindhárom levelének fizikális vizsgálatára, melyeken a toxicitás mértékének megjelenését a nitrát, a klorát és a glutamin különböző koncentráció kombinációjainak hatásaiként regisztráltunk. Értékelésünket a 12. táblázat tükrözi.

Az egyhetes hidropóniás növénynevelést követően a növények 15-18 cm magasságot értek el és kétleveles állapotúak voltak. Az ezt követő kezelések hatása további 4 nap elteltével kezdett megjelenni, és a 8. napon észleltük a legnagyobb különbségeket. Addigra a növények zászlós levele elérte a 25-30 cm-es hosszúságot, 2. levelük 20-27 cm közötti volt, és a 3. levél is kifejlődött 9-12 cm hosszúra. A kezelések hatásaként a növények hossz méretében és a zászlós levél állapotában nem tapasztaltunk lényeges különbséget. A klorotikus tünetek a 2. és – annál is fokozottabban – a 3. levélen jelentkeztek, a levelek színében-állagában és állásában (ld. 12. táblázat). A kezelések hatásaként tapasztalt különbségek ezt követően, a növények két alsó levelének fokozatos elszáradásával, egyre csökkentek.

Megfigyeléseink alapján a kezelések 8. napján a vizsgált minták között jól látható különbségeket tapasztaltunk. A kontroll növények (ld. 1, 6, 8 és 13 számú minták) a nevelési körülményeknek megfelelően fejlődtek, egészségesek maradtak. A legnagyobb mértékű elváltozást a 2,0 mM nitrát és 15 mM klorát kezelést kapott növényeken (12 számú minta) tapasztaltunk, melyek 3. levele teljesen elszáradt. A növekvő klorát koncentráció mindkét nitrát adag mellett fokozódó klorotikus tünetekben mutatkozott meg (ld. 2, 3, 4 és 5, ill. 9, 10, 11 és 12 számú minták). A nagyobb nitrát koncentráció csökkentette ugyanakkora mennyiségű klorát toxicitását (ld. 4 és 9, ill. 5 és 10 számú minták). A 3 mM glutamin jelenléte mindkét vizsgált kombinációban majdnem teljesen meggátolta a klorotikus tünetek megnyilvánulását (ld. 6 és 7, ill. 13 és 14 számú minták).

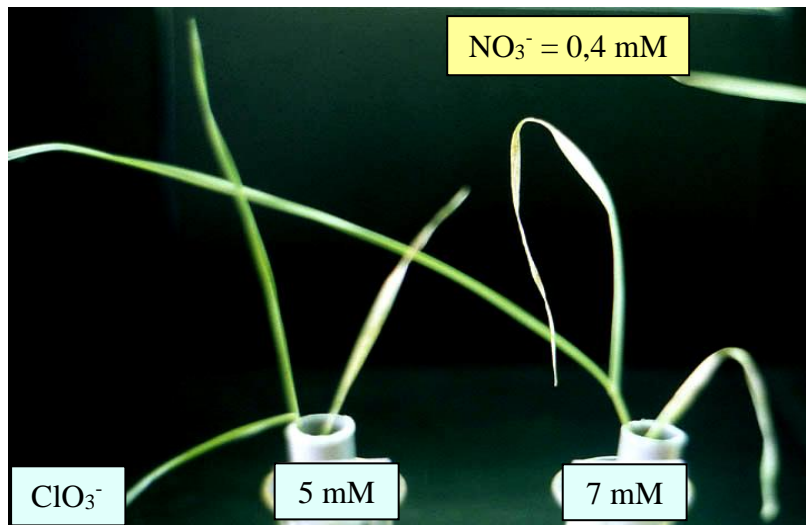
Az azonos nitrát illetve klorát kezelések melletti különböző klorát illetve nitrát koncentrációk toxikus hatásában jelentkező különbségek 15 napos csíranövényeken a kezelések 8. napján az 1., 2., 3. és 4. képen láthatóak.

12. táblázat. A klorát különböző kezeléskombinációkban megjelenő toxikus tünetegyüttese 15 napos csíranövényeken 8 napos kezelés után

Minta- szám	Kezelés mM			Levelek		
	NO ₃ ⁻	ClO ₃ ⁻	Gln	1.	2.	3.
1	0,4	—	—	zöld egyenes	zöld egyenes	zöld egyenes
2	0,4	1	—	zöld egyenes	zöld lehajlott	1/3 klor. elhajló
3	0,4	3	—	zöld egyenes	1/2 klor. lehajlott	1/3 elsz. elhajló
4	0,4	5	—	zöld egyenes	1/3 elsz., 1/3 klor. lehajlott	1/2 elsz., 1/3 klor. lehajlott
5	0,4	7	—	zöld elhajló	1/2 elsz., 1/2 klor. lehajlott	2/3 elsz., 1/3 klor. lehajlott
6	0,4	—	3,0	zöld egyenes	zöld egyenes	zöld egyenes
7	0,4	7	3,0	zöld egyenes	zöld elhajló	enyhén klor. lehajlott
8	2,0	—	—	zöld egyenes	zöld egyenes	zöld egyenes
9	2,0	5	—	zöld egyenes	zöld elhajló	1/3 klor. elhajló
10	2,0	7	—	zöld egyenes	1/4 klor. elhajló	1/2 elsz., 1/2 klor. lehajlott
11	2,0	10	—	zöld elhajló	1/5 elsz., 1/2 klor. lehajlott	2/3 elsz., 1/3 klor. lehajlott
12	2,0	15	—	zöld lehajlott	1/3 elsz., 1/2 klor. lehajlott	teljesen elsz. lehajlott
13	2,0	—	3,0	zöld egyenes	zöld egyenes	zöld egyenes
14	2,0	7	3,0	zöld, egyenes	zöld egyenes	zöld elhajló

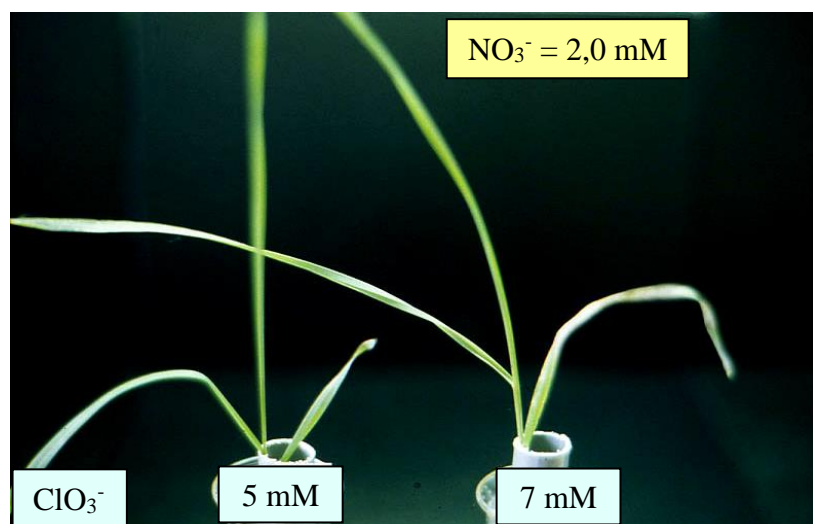
Rövidítések: elsz. = elszáradt

klor. = klorotikus

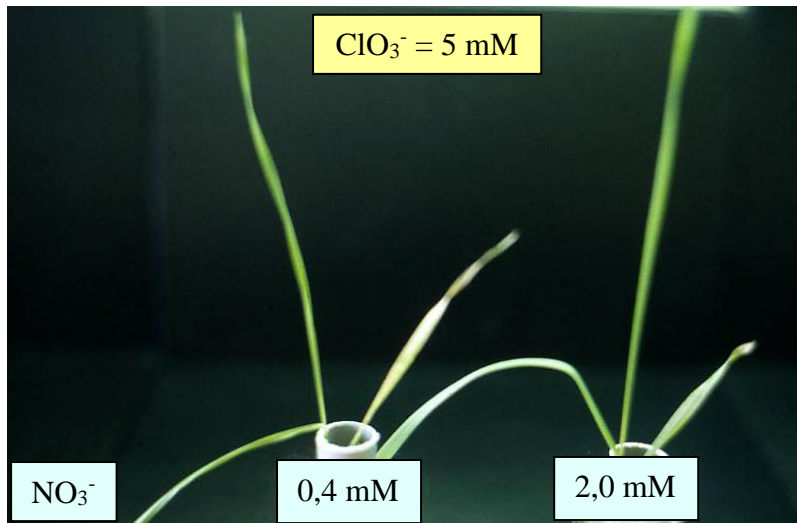


1.kép. 5 és 7 mM ClO₃⁻ kezelés tünetei 0,4 mM NO₃⁻ mellett

Az 1. és a 2. kép azt mutatja, hogy a nagyobb klorát koncentráció súlyosabb toxikus tüneteket okozott mindkét nitrát koncentráció mellett, mint a kisebb. Ez a hatás a kisebb nitrát koncentráció esetén nyilvánul meg erősebben.

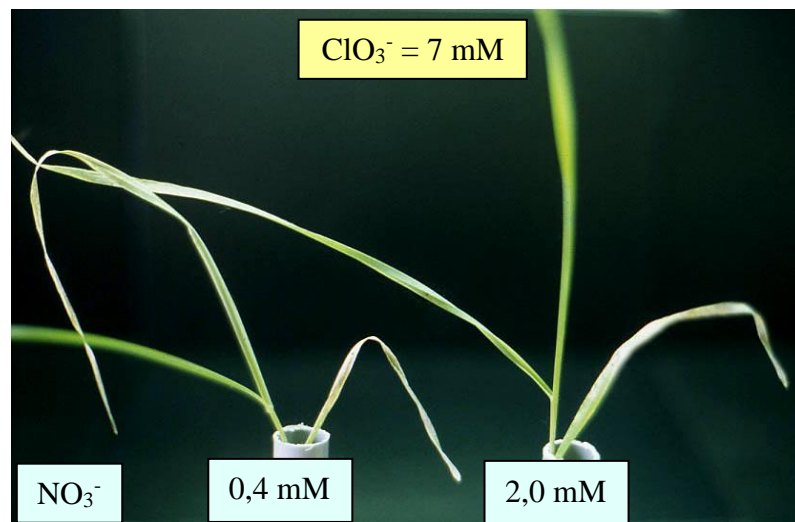


2.kép. 5 és 7 mM ClO₃⁻ kezelés tünetei 2,0 mM NO₃⁻ mellett



3. kép. 0,4 és 2,0 mM NO₃⁻ kezelés tünetei 5 mM ClO₃⁻ mellett








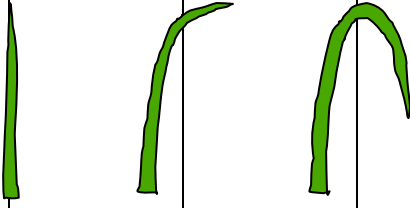
A 3. és a 4. képen látható, hogy a nagyobb nitrát koncentráció mindkét klorát koncentráció esetében csökkentette a klorát toxikus hatását. Ez a különbség a magasabb klorát koncentráció mellett kifejezettebb.



4. kép. 0,4 és 2,0 mM NO₃⁻ kezelés tünetei 7 mM ClO₃⁻ mellett

A klorátnak a növények fizikális állapotára kifejtett hatását vizsgáló kísérletsor eredményei szerint, a 0,4 mM KNO₃ indukció melletti, 7 mM KClO₃ koncentráció megfelelő érzékenységű megfigyelést tesz lehetővé egy hetes hidropóniás nevelésű csíranövények további 8 napos klorátos kezelését követően.

A toxikus tüneteket a levelek elszíneződése-állaga és állása tekintetében a következőképpen osztályoztuk (ld 13. táblázat):

Osztály	Elszíneződés-állag			Megjelenés
	zöld (hányad)	klorotikus (hányad)	elszáradt (hányad)	
1.	1	0	0	
2.	2/3	1/3	0	
3.	1/4	1/2	1/4	
4.	1/6	1/2	1/3	
5.	1/6	1/3	1/2	
6.	0	1/4	3/4	
7.	0	0	1	
Osztály	Állás			
	1. Egyenes	2. Elhajló	3. Lehajlott	

A két választott jellemző tulajdonság szerinti osztályokba sorolás búza NRA szintjének klorát toxicitás érzékenysége alapján történő objektív minősítésére ad lehetőséget. A módszert szemikvantitatív tesztként alkalmasnak tartjuk NRA szintek összehasonlító vizsgálatára.

3.2. A búza genetikai transzformációja

3.2.1. Az *in vitro* tenyésztés körülményei

3.2.1.1. A búza genotípus kiválasztása

A génbelövéshez jól kalluszosodó és regeneráló képességű búza genotípus éretlen embrióit szándékoztuk izolálni, hogy a transzformációs munkához fiatal, differenciálatlan sejtek álljanak rendelkezésre, és ezekből könnyen növényt nevelhessünk. Ehhez négy búza genotípus három fontos szövettenyésztési tulajdonságát (izolálás után kihajtott embriók száma, kalluszosodási százalék, növényregenerálás) vizsgáltuk meg, melynek eredményeit a 14. táblázat foglalja össze. A táblázat második oszlopában látható, hogy a vizsgált fajták között jelentős különbséget találtunk a kihajtott embriók százalékában. Kísérleti szempontból a minél alacsonyabb kihajtási százalék a kedvező, amelyet a sorban harmadik genotípus mutatott. A táblázat harmadik oszlopa a kalluszosodási százalékokat összegzi, amely tulajdonságban a legmagasabb értéket adó genotípusnak ugyanaz a fajta bizonyult. A kalluszosokat hat cikluson keresztül passzáltuk, majd növényeket regeneráltunk. Ezzel modellezve a génteszformációt majdan követő szelekciós szakaszt és a vélhetőleg transzgenikus növények regenerálását, úgy találtuk, hogy a legjobb alapanyagnak a CY-45 tavaszi búza ígérkezik.

14.táblázat. Búza genotípusok szövettenyésztési tulajdonságainak összehasonlítása

Fajta	Embrióképzés (%)	Kalluszosodás (%)	Növényregeneráció*
<i>GK Délibáb</i>	18	78	39
<i>GK Góbé</i>	8	85	50
<i>CY-45</i>	2	97	72
<i>GK Kunság</i>	11	88	49

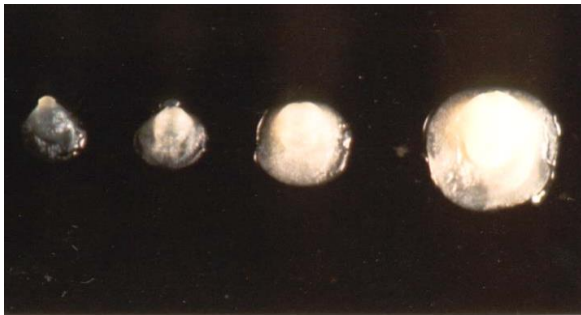
* Az ötödik passzálás utáni kalluszosok %-ában.

3.2.1.2. Az *in vitro* növény–sejt–növény rendszer a CY-45 genotípuson

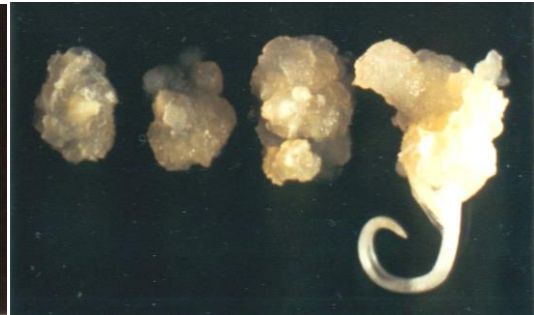
A sejtenyészetek alapanyagát a 10-11 napos virágzásban levő kalászkok (ld. 5. kép) adták, melyekből különböző fejlődési állapotú éretlen embriókat preparáltunk (ld. 6. kép). Az éretlen embriók a 2 mg/l 2,4-D tartalmú MS táptalajon a tenyésztés 5.-8. napján dedifferenciálódni kezdtek, majd kalluszsövetet fejlesztettek. Egy hónapos tenyésztés után a különböző fejlettségi állapotú embriók a tenyésztési körülményekre eltérően reagáltak (ld. 7. kép).



5. kép. Virágzó kalászkok



6. kép.Éretlen embriók



7. kép.Éretlen embriók kalluszképzése

A 6. és a 7. kép összehasonlításával látható, hogy az embriók érésük korai fázisában alkalmasak kalluszsövet képzésére, míg az érettebbnél (a 7. képen a jobb oldali embrió) redifferenciálódási folyamat indult meg, amit hajtás- és gyökérbépződés jelez. A sejtenyésztés során jól osztódó kallusztenyészeteket kaptunk, melyek regenerációs képességük lényeges elvesztése nélkül 4-szer átpasszálhatók és továbbszaporíthatók voltak.

A növényregenerálás a MS_{zizi} táptalajon két-három hét után indult meg. A képződő zöld hajtások 1 hónapos korukban 0,1 mg/l IES-t tartalmazó MS gyökereztető táptalajra kerültek, ahol további 3-4 hét alatt meggyökeresedtek. Az *in vitro* tenyésztett növényeket cserepekbe ültették, majd fóliás takarással edzettük, és üvegházban neveltük. A növényregeneráció folyamatának fázisait a 8.kép mutatja

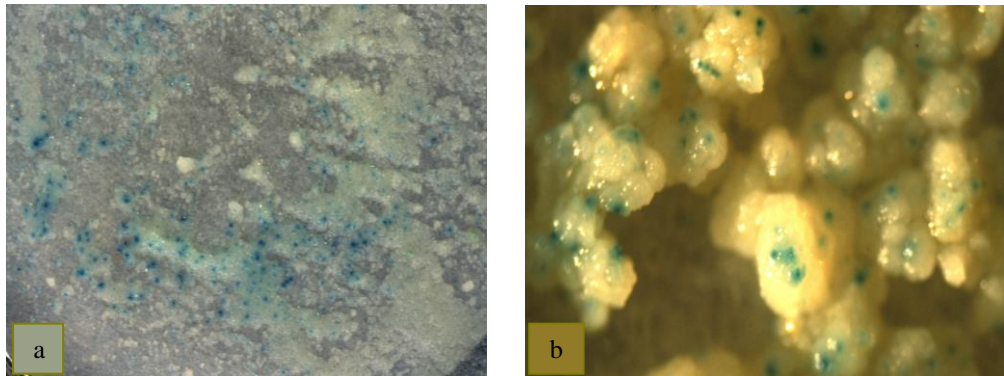


3.2.2. Transzgénikus búza előállítása

3.2.2.1. Génbelövés

A két plazmid belövéséhez a CY-45 éretlen embrióiból dedifferenciálódott 1-25 nap korú kallusztényészeteket használtunk. A pAHC25 *gus* és *bar* valamint a pRT101 *cnx1* antiszenz génkészlettel ellátott vektorok kotranszformációval kerültek bevitelre. A belövés paramétereinek pontosítása céljából a génbelövést követő 2. napon vizsgáltuk a belőtt genetikai elemek integrálódásának gyakoriságát. Erre a *gus* riporter gén megnyilvánulása, a GUS enzim működése alapján következtettünk. A sikeres génbevitel helyét a kalluszszövetek hisztokémiai kék megfestődése jelzi (ld. 9.kép). A képen megfigyelhető az arany részecskék – hatásos integrálódásuk helyét jelző – koncentrikus elterülése (a) és a kalluszsejtek közötti gyakorisági eloszlása (b). A *gus* gén megnyilvánulása alapján, a legmegfelelőbb belövési távolságot a részecskebelövő berendezés egyéb működtetési paramétereinek változatlansága

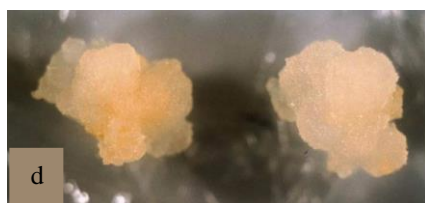
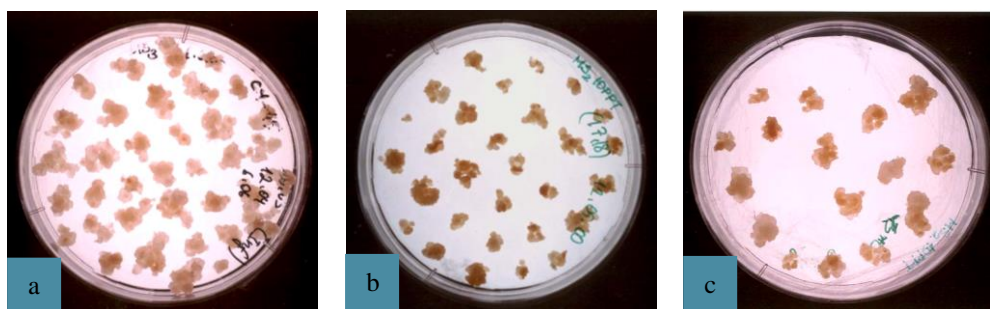
mellett, 12 cm-re állítottuk be. A további génbelövési kísérletek ezen technikai paraméterek mellett folytak.



9. ábra. A *gus* riporter gén megnyilvánulása kallusz szöveten
 a. Koncentrikus foltok mutatják a génbelövés irányultságát
 b. Az enzimreakciót jelző festődés egyenetlen megjelenése

3.2.2.2. Szelekció és génexpresszió

A belőtt kalluszokat hat-nyolc hónapig öt hetenkénti passzálassal bialaphos tartalmú táptalajon tenyésztettük. A *bar* gén megnyilvánulását, a foszfinitricin herbicid hatását túlélő sejtek mutatták. A transzformált sejtek növekvő kolóniája sárgás-fehér intakt kalluszokat eredményezett, míg a herbicid érzékeny egyedek kalluszai megbarnultak, a sejtek elpusztultak (ld. 10. kép).

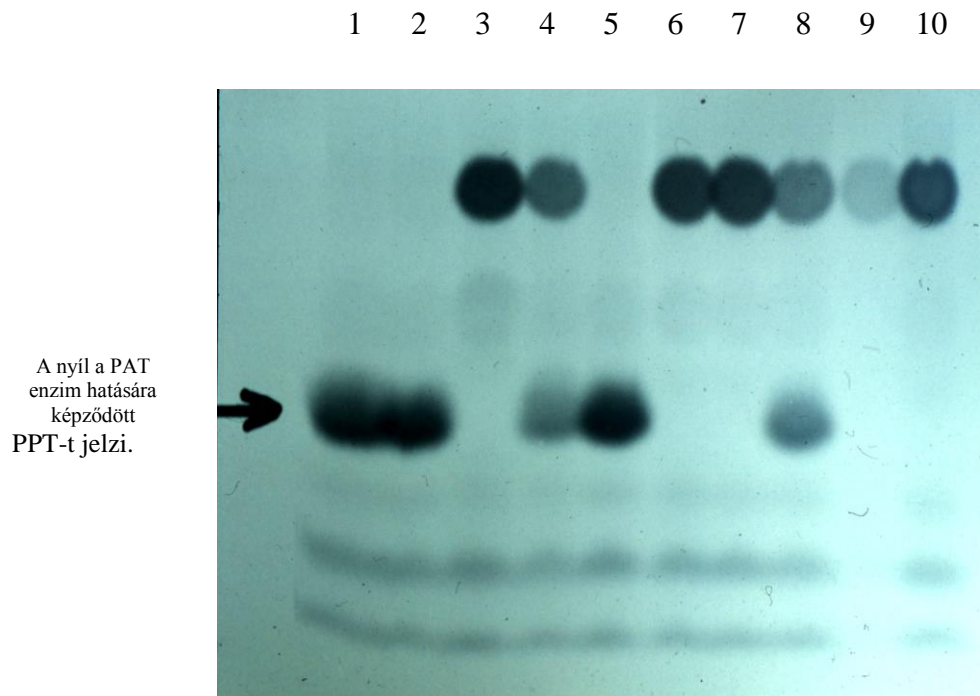


10.kép Kallusz szelekció *bar* génre

- a.,Vad típusú sejtek hatóanyagmentes táptalajon
- b.,Vad típusú sejtek hatóanyag tartalmú táptalajon
- c.,Transzformált sejtek hatóanyag tartalmú táptalajon
- d.,Hatóanyag rezisztens kalluszok

A növekvő szelekciós nyomás – a kezdeti 3 mg/ml, majd a második passzálástól 5 mg/ml bialaphos koncentráció – és a szelektálás többszöri ciklusa hatékony szelektálásra adott lehetőséget.

Minden egyes herbicid rezisztens kallusz PAT enzim aktivitását megvizsgáltuk. A kromatográfias futtatás előhívott mintázata (ld. 11. kép) azt mutatta, hogy nem minden rezisztensként szelektált kalluszban volt kimutatható a herbicidet hatástalanító enzim működése.

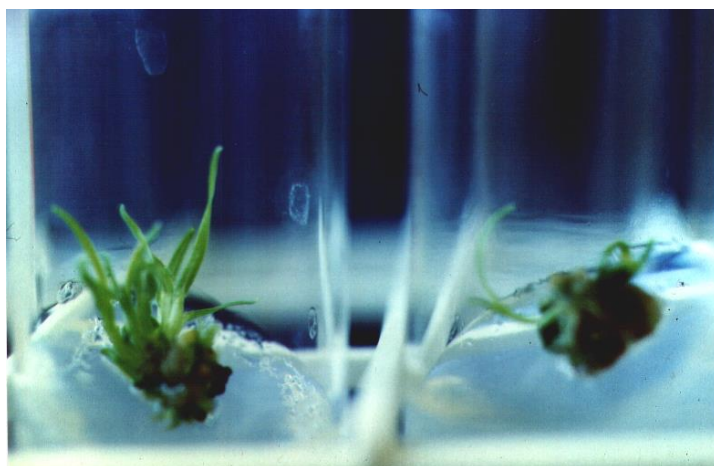


11.kép. A génbelövést követően bialaphos hatóanyagon szelektált kalluszkok foszfinotricin-acetiltranszferáz (PAT) aktivitás vizsgálata

- 1 = bar génel transzformált minta (+ kontroll)
- 2, 4, 5 és 8 = PAT⁺ minták
- 3, 6, 7 és 9 = PAT⁻ minták
- 10 = nem transzformált minta (- kontroll)

3.2.2.3. Növényregeneráció

A bialaphos szelekciót és a PAT enzimaktivitás mérést követően a kalluszokból növényeket regeneráltunk. Az első hajtások megjelenése a regeneráló táptalajra történt passzálást követő 2,5-4 hét után következett be (ld. 12. kép). A hajtások további két hetes fejlődés után hormonmentes táptalajra kerültek, ahol 4-5 hét elteltével meggyökeresedtek (ld. 13.kép). A húsz PAT⁺ kalluszból tíz növénykét sikerült regenerálni.



12. kép
Embriogén kalluszok
hajtás regenerációja



13 kép.
A hajtások
gyökereztetése

Az *in vitro* növényeket edzés után – fóliás takarás és magas páratartalom – fitotron kamrába ültettük ki. A növények leveléből ismételtelen elvégeztük a PAT enzimaktivitás tesztet .Minden PAT⁺ kalluszból előállított növény PAT⁺-nak bizonyult, azaz a transzformált *bar* gén működését a regenerált növényekben is sikerült kimutatni.

3.2.2.4. A transzgénikus növények *in vivo* vizsgálata

A kiültetett növényeket négy-hat hetes korukban bialaphos 0,1%-os oldatával lepermeteztük, hogy elvégezzük az *in vivo* enzimtesztet. A korábbi vizsgálatokban PAT⁺-nak bizonyult növények herbicid hatóanyaggal szemben is rezisztenciát mutattak. A T₀ nemzedék felnevelt növényei között hat egyed szemet kötött, azaz fertilis volt.

A pAHC25 vektor transzformáció egyes fázisainak eredményeit a belótt inokulumok korával összefüggésben a 15. táblázat mutatja.

15. táblázat. A pAHC25 vektor transzformációs kísérlet eredményei a belótt inokulumok korával összefüggésében

Az embrió/ /kallusz kora (nap)	Belótt mikro- kalluszok (db)	PPT rezisztens kalluszok (db)	PAT ⁺ kalluszok (db)	Független transzfor- mánsok (db)	Fertilis transzgénikus növények (db)
1	1000	0	0	0	0
5	950	6	5	1	0
10	1000	7	4	3	0
15	1000	6	6	4	4
20	850	4	2	2	2
25	900	6	3	0	0
Összesen:	5700	29	20	10	6

3.2.3. A transzgének vizsgálata az utódnemzedékekben

A pAHC25 plazmid transzformáns *bar* génjének öröklődését foszfinotricin herbicid rezisztencia ellenőrzésével, a pRT101 plazmiddal bevitt *cnx1* antiszenz megnyilvánulását az utódnemzedékek NR aktivitásának meghatározásával és klorát teszttel vizsgáltuk.

3.2.3.1. A transzgénikus növények foszfinotricin rezisztencia vizsgálata

A T₀ nemzedék hat fertilis egyedének utódait egy-egy transzgénikus vonalként (106-3a, 116, 117, 124, 128 és 129) üvegházban neveltük tovább. Az öntermékenyítéssel előállított T₁ generációt a foszfinotricin rezisztencia öröklődésének vizsgálata céljából foszfinotricin hatóanyagú totális gyomirtószerrel (Finale 14 SL) permeteztük. A kísérlet eredményét kéthetes kezelést követően értékeltük. Eredményét a 16. táblázat mutatja.

16. táblázat. A *bar* transzgénikus vonalak T₁ nemzedékének herbicid rezisztencia vizsgálata.

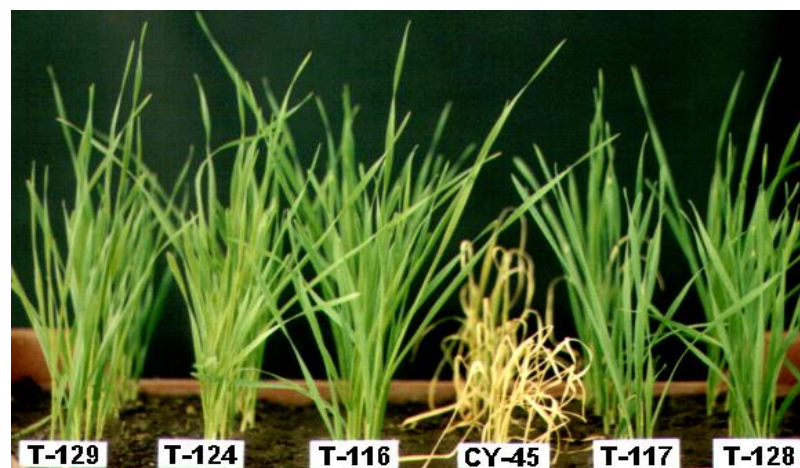
Növényvonal	PTT kezelt növények		PTT rezisztens növények	
	(db)	(db)	(db)	(%)
106-3a	150	108	108	72
116	150	114	114	76
117	150	107	107	71
124	150	119	119	79
128	150	116	116	77
129	150	110	110	73
CY-45	150	150	150	100

A kísérlet eredménye azt mutatja, hogy mindegyik transzgénikus vonal egyedeinek megközelítőleg $\frac{3}{4}$ -e bizonyult ellenállónak a herbicid permetezőszerekkel szemben, míg a kontrollként vizsgálatba vont CY-45 egyedei a vegyszerhatásra mind érzékenyek voltak és elpusztultak. A herbicides kezelésnek a 128-as transzgénikus vonalon kifejtett hatása a 14. képen látható.

A transzgénikus vonalak T₁ nemzedékének fertilis egyedeiből magot fogva, azokat továbbszaporítottuk. A herbicid hatóanyaggal permetezve kiszelektáltuk az érzékeny egyedeket. Így a későbbi nemzedékekben mind nagyobb arányban nyilvánult meg a *bar* transzgen jelenléte. A transzgénikus növényállomány PTT rezisztenciára mutatott nagyfokú homogenitását mutatja a 15. kép.



14. kép
A *bar* gén 3:1
arányú
hasadásának
képe, a 128 jelű
transzgénikus
vonal T₁
generációjában.



15.kép. A *bar* transzgénikus vonalak herbicid rezisztenciájának homogenitása T = transzgénikus vonalak, CY-45 = kontroll

3.2.3.2. A transzgénikus növények nitrátreduktáz aktivitás vizsgálata

A transzgénikus vonalak nitrátreduktáz aktivitását a T₁ és a T₂ nemzedékek 10 napos csíranövényeiben valamint a folyamatosan fenntartott és tenyésztett kallusztenyészetekben vizsgáltuk. A vizsgálati minták a növények második levelei illetve 1-1 Petri-csésze homogenizált kalluszhalma voltak. Az enzimaktivitások értékeit *in vitro* NRA teszttel határoztuk meg. A T₁ generációban vonalanként 7-7 egyedet vizsgáltunk, melyek NR aktivitás értékei a 17. táblázatban láthatóak.

17. táblázat. A transzgénikus vonalak NR aktivitása a T₁ nemzedékben

Növény- egyed	NR aktivitás		Növény- egyed	NR aktivitás		Növény- egyed	NR aktivitás	
	(*)	(%)		(*)	(%)		(*)	(%)
106-3a/1	23,7	85	117/1	8,7	31	128/1	27,0	97
106-3a/2	27,0	97	117/2	6,2	22	128/2	28,8	104
106-3a/3	22,3	80	117/3	7,2	26	128/3	25,7	92
106-3a/4	18,0	65	117/4	11,0	40	128/4	26,8	96
106-3a/5	21,2	76	117/5	8,0	29	128/5	24,7	89
106-3a/6	26,2	94	117/6	12,0	43	128/6	29,3	105
106-3a/7	21,8	78	117/7	8,7	31	128/7	24,3	87
116/1	27,7	99	124/1	3,0	11	129/1	26,8	97
116/2	27,5	99	124/2	7,2	26	129/2	26,2	94
116/3	23,7	85	124/3	8,0	29	129/3	22,7	81
116/4	22,8	82	124/4	6,2	22	129/4	22,2	80
116/5	24,7	87	124/5	4,5	16	129/5	28,5	102
116/6	25,5	92	124/6	3,8	14	129/6	25,7	92
116/7	23,7	85	124/7	4,7	17	129/7	25,3	91
CY-45**	27,8	100	CY-45**	27,8	100	CY-45**	27,8	100

* (nmol NO₂⁻ × g⁻¹ × min⁻¹)

** mért értékek átlaga

% a CY-45 kontroll átlagértékére vonatkoztatva

A 6 vonal NR aktivitás eredményei azt mutatják, hogy a *bar* rezisztencia gén átvitele mellett nem volt mindegyik esetben sikeres a kotranszformáció. Csupán a 117 és a 124 vonal mutat a *cnxI* gén rendellenességére utaló jelentős NR aktivitás csökkenést. A 128 és 129 vonal egyedei között olyanok is voltak, amelyek a kontrollhoz képest magasabb aktivitással rendelkeztek. Az egy vonalon belüli egyedekre vonatkozó aktivitás adatok között lényeges eltérések látszanak. Az adatok megbízható értékelése céljából, azokat egytényezős varianciaanalízisnek vetettük alá. A statisztikai analízis eredményét a 18. táblázat mutatja.

18. táblázat. A transzgénikus genotípusok NRA-nak varianciaanalízise a T1 nemzedékben

Tényező	SQ	FG	MQ	F
Összes	3362,8	41		
Ismétlés	44,0	6		
Genotípus	3086,8	5	617,36	118,72
Hiba	156,0	30	5,20	

$$F_{0,1\%} = 5,53$$

A varianciaanalízis eredményeként számított $F_{\text{Genotípus}} > F_{0,1\%}$. Ezért igazoltnak tekintjük, hogy a genotípusok között szignifikáns különbség van. Az egyes genotípusok közötti adott szignifikancia szintekhez tartozó különbségek megítélése céljából eredményeinket *t* próbával vizsgáltuk tovább. A mérésorozat statisztikai értékelését a 19. táblázat, a genotípusok közötti szignifikanciát a 20. táblázat mutatja.

19. táblázat. A transzgénikus T₁ nemzedék genotípusok NRA eredményeinek statisztikai értékelése

Ismétlés n = 7	Genotípus					
	106-3a	116	117	124	128	129
NRA*	22,9	25,1	8,8	5,3	26,7	25,3
SD	3,08	1,92	2,04	1,84	1,92	2,23
CV%	13,45	7,64	23,18	34,72	7,19	8,80

* (nmol NO₂⁻ × g⁻¹ × min⁻¹)

$$SzD_{0,1\%} = 4,46 \quad SzD_{1\%} = 3,36 \quad SzD_{5\%} = 2,49 \quad SzD_{10\%} = 2,07$$

20. táblázat. A transzgenikus T₁ nemzedék genotípusok közötti szignifikancia vizsgálata

Genotípusok	t	Szignifikancia			
		t _{10%} = 1,70	t _{5%} = 2,04	t _{1%} = 2,76	t _{0,1%} = 3,66
*106 – 116	1,80	+	–	–	–
106 – 117	11,57	+	+	+	+
106 – 124	14,43	+	+	+	+
106 – 128	3,12	+	+	+	–
106 – 129	1,97	+	–	–	–
116 – 117	13,37	+	+	+	+
116 – 124	16,24	+	+	+	+
116 – 128	1,31	–	–	–	–
116 – 129	0,16	–	–	–	–
117 – 124	2,87	+	+	+	–
117 – 128	14,69	+	+	+	+
117 – 129	13,54	+	+	+	+
124 – 128	17,56	+	+	+	+
124 – 129	16,41	+	+	+	+
128 – 129	1,15	–	–	–	–

*106-3a

A szignifikancia vizsgálat azt mutatja, hogy a 117-es és a 124-es vonalak még a P = 0,1 %-os szinten is különböznek a többitől NRA tekintetében, míg a 106-3a, a 116, a 128 és a 129 genotípusok nem mutatnak különbséget egymástól. A két alacsony enzimaktivitású genotípus viszont egymástól már nem különbözik a P = 0,1 %-os szinten. Ezért a további kísérleteket a NR aktivitás csökkenést P = 0,1 %-os szinten is mutató 117 és 124 vonallal folytattuk.

A T₂ generáció növényeinek NRA-át ugyanazokból a növényi sejtekből származó kallusztenyészetek NRA értékeivel történő összehasonlításban vizsgáltuk. A vizsgált minták számát és a NR aktivitás átlagértékeit a 21.táblázatban tüntettük fel.

21. táblázat. A 117 és 124 vonal T₂ növénynemzedékének és kalluszainak NRA vizsgálata.

Növényvonal	NR aktivitás (nmol NO ₂ ⁻ × g ⁻¹ × min ⁻¹)					
	Növény	(%)	(n)	Kallusz	(%)	(n)
117	24,2	91	(9)	29,6	83	(6)
124	21,8	82	(9)	26,7	75	(5)
CY-45	26,7	100	(17)	35,7	100	(29)

A kallusz szinten mért aktivitások magasabb értékeket mutatnak, mint a növények leveleiből mért adatok. A kallusz szövetek közötti enzimaktivitás különbségek nagyobbak, mint a növénymintákból mértékéi. A két transzgenikus vonal nem mutat olyan mértékű aktivitás csökkenést, mint a T₁ nemzedéknél (ld. 19. táblázat értékeivel összehasonlítva). A különbségek objektív elbírálására varianciaanalízissel megvizsgáltuk a NRA értékének genotípus és növényi szövet függőségét. A statisztikai próba adatait a 22. és 23. táblázat mutatja.

22. táblázat. Variacionális elemzés a NRA genotípus- és szövetfüggőségének elbírálására

Tényező	SQ	FG	MQ	F
Összes	116,29	5		
Genotípus	49,21	2	24,65	9,86
Növényi szövet	62,08	1	62,08	24,83
Hiba	5,0	2	2,5	

A különböző valószínűségi szintekhez tartozó F_{krit} és t értékek:

		P = 10 %	P = 5 %	P = 1 %
Genotípus	F_{krit}	9,00	19,00	99,00
Növényi szövet	F_{krit}	8,53	18,51	98,49
	T	2,92	4,30	9,93

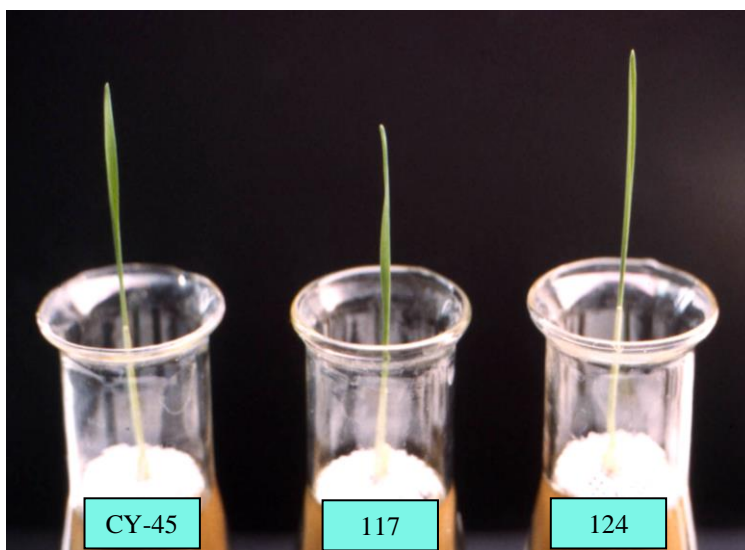
23. táblázat. Szignifikancia vizsgálata a NRA genotípus- és szövetfüggőségének értékelésére

	SzD _{10%}	SzD _{5%}	SzD _{1%}
Genotípusok között	4,61	6,79	15,69
Növényi szövetek között	3,77	5,55	12,81
Kombinációk között	1,69	2,49	5,76

A genotípusok között a NRA tekintetében csak $P = 10\%$ szinten mutatkozik szignifikáns különbség ($F_{9,86} > F_{krit} 9,00$). A növényi szövetek NRA összehasonlításában $P = 10\%$ ($F_{24,83} > F_{krit} 8,53$) és $P = 5\%$ ($F_{24,83} > F_{krit} 18,51$) is szignifikáns különbség tapasztalható.

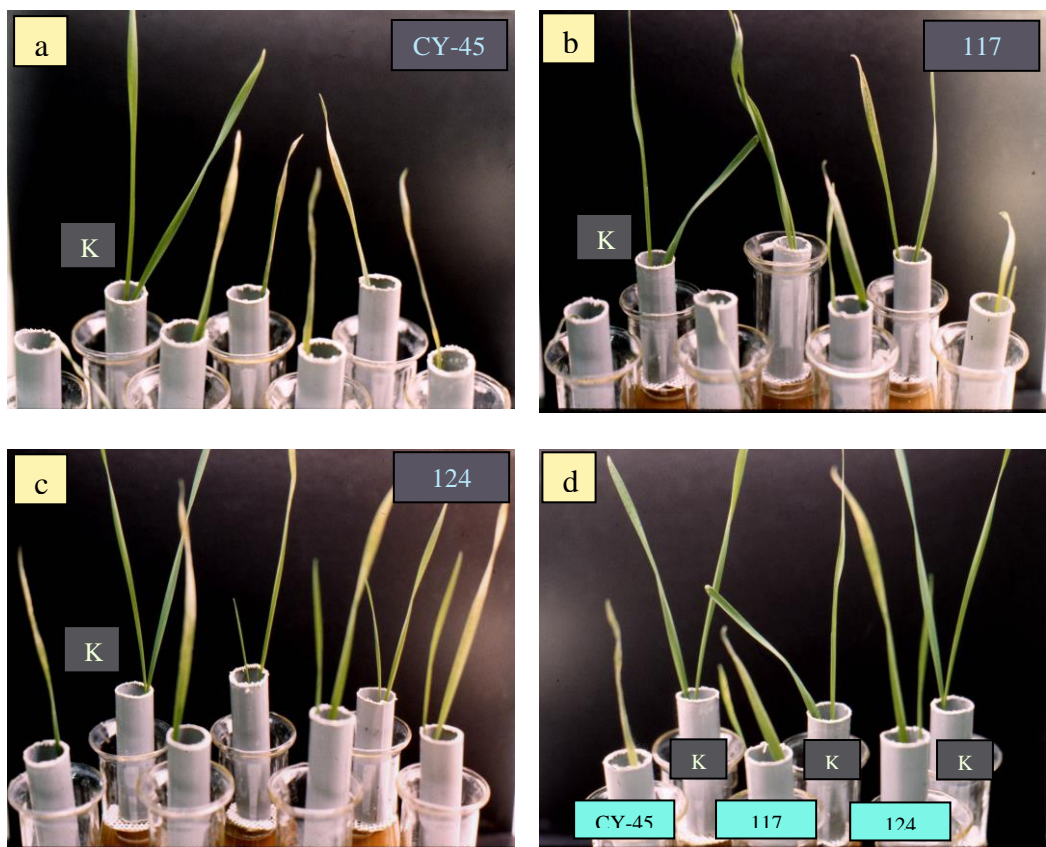
3.2.3.3. A transzgénikus növények klorát rezisztencia vizsgálata

A transzgénikus növények T_2 nemzedékében vizsgáltuk a csökkent NR aktivitású 117 és 124 vonal klorát mérgezéssel szembeni viselkedését. A hidropóniás körülmények között felnevelt növényeket az előzetes vizsgálatok eredményeként beállított klorát teszttel minősítettük. A $0,4\text{ mM NO}_3^-$ indukciója mellett a 7 mM ClO_3^- toxikus hatását a mérgezést követő 6. napon értékeltük. A klorát hatásának vizsgálata a kontroll CY-45 és a két transzgénikus vonal növényegyedeire a 16., és a 17. képen láthatóak.



16. kép

A CY-45 kontroll, valamint a 117 és 124 transzgénikus vonalak 3 napos csíranövényei



17.kép. A klorát kezelés hatására megjelenő toxikus tünetek a CY-45 (a), a 117 (b) és a 124 (c) genotípus egyedein valamint a három vonal egy-egy reprezentatív egyedének összehasonlításában (d).
K = klorát kezelés mentes kontroll.

A 16. képen látható, hogy a csírázási erély tekintetében a vizsgált három genotípus egyedei hasonlóak voltak, a 3 napos csíranövények fejlődési állapota megközelítően azonos szintű. A genotípusok reagálása a klorátos kezelésre eltérő volt. A 117-es vonal egyedei mutatták a legnagyobb heterogenitást és a tünetek alapján a CY-45 kontroll vonal egyedeivel mutattak inkább nagyobb hasonlatosságot, mint a 124-es vonal egyedeivel. A 124-es vonal egyedei között enyhébb mértékben és közel azonos fokon jelentkeztek a klorózis tünetei. A 17. képen az *a*, *b* és *c* részlet külön-külön mutatja a három genotípus reprezentánsait, a bal oldali hátsó klorát kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A kép *d* részlete a genotípusok egy-egy jellemző, a kezelésre átlagosan reagáló egyedét hasonlítja össze egymással, és a hátsó sor azonos genotípusú kontroll növényeivel. Az általunk kifejlesztett szemikvantitatív klorát teszttel 3 ismétlésben, ismétlésenként és genotípusonként 30-30 növény átlagában végzett értékelés a 22. táblázatban látható.

22. táblázat. A CY-45, a 117 és 124 genotípusok szemikvantitatív klorát tesztjének értékelése

Genotípus n = 21	Állás		Elszínözödés-állag	
	1. levél	2. levél	1. levél	2. levél
CY-45	2	3	2	5
117	2	2	1	3
124	1	1	1	2

A teszt értékelése a képeken látható hatásokkal összhangban azt mutatja, hogy a 117 és a 124 vonal egyedei a kontroll növényekhez képest a klorát toxikus hatását jobban elviselték. A két vonal közül a 124 mutat nagyobb toleranciát. Ez a különbség összhangban van a NRA különböző mértékben csökkent értékeivel.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. A nitrát asszimiláció vizsgálata

4.1.1. A nitrát felvétele

Búza csíranövények nitrát felvételét hidropóniás tápoldat két különböző nitrát koncentrációja mellett vizsgáltuk. A 0,4 mM nitrát koncentráció 24 órát követően $28,7 \pm 2,3 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ nitrát felvételével járt, míg a 2,0 mM nitrát koncentráció hatására a nitrát felvétele $37,5 \pm 3,0 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ értéket mutatott. A tápoldat nitrát koncentrációjának ötszörösére növelése csak 1,3-szeres növekedést eredményezett annak felvételében. A nitrát felvételének mértéke a tápoldat nitrát koncentrációjával nem egyenesen arányos. A nitrát bejutása nem egyszerű diffúzióval, hanem a nitrát transzporter (Nrt) enzim szabályozása révén történik. A kisebb nitrát koncentráció melletti relatív nagyobb nitrát felvétel megfelel egy alacsony nitrát koncentrációnál hatékony nagy affinitású Nrt működésének (Lejay et al., 1999; Daniel-Vedele et al., 1998), amely a nitrát által indukált.

A Nrt enzim működését a klorát és a glutamin is befolyásolta. A klorát gátló hatása a magasabb nitrát koncentráció mellett bizonyult hatékonynak. 5 mM klorát alkalmazásánál a 0,4 mM nitrát mellett csak 91 %-ra, míg a 2,0 mM nitrát tartalmú tápoldatból 73 %-ra csökkent a nitrát felvétele. Ugyanezt a tendenciát tapasztaltuk a 7mM-os klorát kezelés esetében, melynél a nagyobb nitrát koncentrációnál 89 %-ra, a kisebbnél pedig 64 %-ra csökkent a nitrát felvétele a klorát kezelést nem kapott mintákhoz képest (ld. 4. táblázat). Ugyanakkora klorát koncentráció a kisebb nitrát koncentrációnál relatív kevésbé gátolja a nitrát felvételét, mint a nagyobb adagú nitrát kezelés esetében. Ezekből az adatokból arra következtethetünk, hogy a klorát ugyan mindkét nitrát koncentráció mellett gátolja a nitrát felvételét de elsődleges transzporjuk két különböző Nrt rendszeren keresztül valósul meg. A nitrát felvétele szempontjából hatékonyabb Nrt a klorát transzportját csak kis mértékben segíti elő. A klorát felvétele döntően a nitrát felvételében kis affinitással működő, csak nagy nitrát koncentráció esetén indukált Nrt működése révén következik be. A nitrát kis külső koncentrációja a

nitrát felvételében nagy hatékonyságú transzportert működtet, mely a klorát felvételére kevésbé érzékeny. Ha a nitrát külső koncentrációja emelkedik, felvétele nem nő ugyanakkora mértékben, de a klorát bejutását fokozottan indukálja. Vizsgálataink eredményei alátámasztják két, a külső nitrát koncentráció nagyságától függően aktív, nitrát transzporter rendszer (HATS és LATS) működését (Siddigi *et al.*, 1992.; King *et al.*, 1992.; Glass *et al.*, 1992).

Glutamin gátló hatását a nitrát felvételére csak a vizsgált nagyobb koncentrációja mellett tapasztaltuk. Ezt a hatást a két nitrát koncentráció (0,4 mM és 2,0 mM), valamint klorát hiánya és jelenléte (7mM) esetén is közel azonosnak mértük. A kisebb nitrát koncentrációnál 50 és 51 %, a nagyobbánál 46 és 43 % volt a nitrát felvétel relatív értéke a klorát- és glutaminmentes kontrollokhoz képest (ld.4. táblázat). Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a glutamin gátló hatása más mechanizmus szerint érvényesül, mint a kloraté. A klorát, koncentrációjának fokozatos növekedésével, egy adott szint feletti nitrát koncentráció indukciója mellett, fokozatosan növekvő gátló hatást fejt ki a nitrát felvételére. A glutamin, vizsgált dózisaival mellett (0,5mM és 3,0 mM), csak a nagyobb koncentrációnál hat gátlóan, és ez független a külső nitrát koncentráció nagyságától. Ebből arra következtetünk, hogy a két gátló anyag a Nrt különböző helyein, különböző módokon hat. A klorát a Nrt aktív centrumában hat és ezzel gátolja az enzim és a nitrát közötti katalitikus reakció lezajlását (Siddigi *et al.*, 1992), a glutamin ezzel szemben feed back szabályozással alloszterikus módon gátol (Gojon *et al.*, 1998).

4.1.2. A nitrát redukciója

A nitrát redukciójára hatással levő tényezők közül három hatóanyag, a nitrát, a klorát és a glutamin, valamint a fény és napi ciklus szerepét vizsgáltuk. Megállapítottuk a nitrát indukciós, továbbá a klorát és a glutamin gátló hatását. Meghatároztuk a nitrátreduktáz aktivitás (NRA) napi ciklus szerinti változását, a fény szabályozó hatását.

4.1.2.1. A nitrát, a klorát és a glutamin hatása

Nitrátmentes tápoldatban fejlődött növények NR aktivitása nem volt mérhető. Nitrát hozzáadásával az enzimaktivitás néhány órán belül ugrásszerűen megnövekedett, 24 óra elteltével a 0,4 mM nitrát koncentráció hatására $22,3 \pm 1,3$ nmol $\text{NO}_2^- \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ értéket vett fel, 2,0 mM mellett pedig $30,4 \pm 2,1$ nmol $\text{NO}_2^- \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ -ra emelkedett. Az eredmények azt bizonyítják, hogy a nitrát nemcsak szubsztrátja a NR-nak, de egyben elsődleges induktora is.

A klorátos kezelés következményeként csökkent a NRA mindkét alkalmazott nitrát koncentráció esetében. Ez a csökkenés a klorát koncentráció növekedésével összhangban nyilvánult meg. A 0,4 mM-os nitrát koncentrációnál az 1, 3, 5, és 7 mM emelkedő klorát koncentráció 93, 78, 47 és 36 %-os NRA-t, a 2,0 mM nitrát alkalmazásánál pedig az 5, 7, 10 és 15 mM klorát tartalom 76, 68, 54 és 42 %-os NRA-t eredményezett a klorátmentes kontroll mintákhoz képest (ld. 6.táblázat). A klorát gátló hatása az alacsonyabb nitrát koncentráció mellett fokozott mértékben érvényesült, mint a magasabb nitrát koncentráció esetében. 5 mM klorát hatásaként 0,4 mM nitrát mellett jelentős NRA csökkenést mértünk (47 %-os NRA), míg a 2,0 mM nitrát tartalmú tápoldatból származó minták NRA-a kevésbé csökkent (76 %) Ugyanez a tendencia érvényesült a 7 mM kloráttal kiegészített kezelések mintáinál is, a kisebb nitrát koncentrációnál mért 36 % és a nagyobbánál mért 68 % NRA bizonyosságaként. A klorát gátló hatásaként a NRA megváltozásában megmutatkozó számszerű eredményeinket a klorát redukációjából képződött klorit toxikus tüneteinek megjelenésében tapasztalt különbségek is alátámasztják (ld 1., 22., 3. és 4. kép). A nitrátnak és a klorátnak a NRA-ra gyakorolt kölcsönhatása alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a két vegyület, ugyanazon enzim szubsztrátjaiként, egymás redukációját befolyásolja. A nitrát-nitrit átalakulásként detektált NRA nem a nitrát és a klorát koncentrációjának nagyságától, hanem egymáshoz viszonyított arányuktól függ. Ennek megfelelően a két anyag verseng a NR katalíziséért, azaz az aktív centrum ugyanahhoz a helyéhez igyekszik kötődni. A klorát NR-ra gyakorolt inhibíciója tehát kompetitív, melyet enzimkinetikai méréseink is igazoltak (ld. 10. ábra és 10. táblázat).

A glutamin mindkét alkalmazott koncentráció esetében (0,5 mM és 3,0 mM) csökkentette a NRA-t. Arányaiban lényegesen nagyobb NRA csökkenést a magasabb koncentrációja okozott, a 0,4 mM nitrát koncentráció melletti 18 %-os NRA, illetőleg

a 2,0 mM nitrát koncentráció mellett 26 %-os NRA relatív értékek szerint, a 0,5 mM os glutamin koncentrációnál mért 76 %-os illetve 82 %-os értékekkel összehasonlítva (ld. 6.táblázat). A magasabb glutamin adag mellett 7 mM koncentrációban adott klorát hatásaként csak kis mértékű aktivitás csökkenést mértünk (a 18 %-kal szemben 13 %, ill. a 26 %-kal szemben 22 % relatív NRA) A glutamin nagyobb koncentrációjának aránytalanul nagyobb gátló hatása, valamint a klorát kezelés kis mértékű befolyása alapján arra következtetünk, hogy inhibíciója nem a nitrát-klorát közös aktív helyen, hanem az enzim más szerkezeti részénél, minden bizonnyal allosztérikus módosítás révén nyilvánul meg. Számos kutatási eredmény vitatja, hogy a NR feed back szabályozásában melyik redukciós terméknek van elsődleges szerepe. A N metabolitok közül többnyire a glutamint teszik felelőssé, mint alapvető represszort, a NRA szabályozásáért (Shiraishi *et al.*, 1992; Vincentz *et al.*, 1993; Dzuibany *et al.*, 1998.). Mások a redukciós reakciósor végtermékeként az ammónia gátló szerepe mellett foglalnak állást (Li *et al.*, 1995.; Aslam *et al.*, 1997.). Vizsgálataink eredménye szerint a glutamin a NRA gátlásában szerepet játszik.

4.1.2.2. A fény és a napi ciklus hatása

A NRA napi változását sötétben tartott és megvilágítás mellett nevelt kallusz és növény mintákban vizsgáltuk 24 órás inkubációt követően. A vizsgálat időtartamát felölelő 12 órában a két vizsgált paraméter mind a négy kombinációjában a napfelkeltét követő idő előrehaladtával a NRA növekedését figyeltük meg, amely maximum értékhez tartott (ld.8. és 9. ábra). A kallusz szövetekből mért NRA-ok magasabbnak bizonyultak, mint a növény eredetűek, akár csak a fényen tartott vizsgálati minták, a sötét kezelésben részesültekkel szemben. Az eltérések a minták szövet minőségét tekintve nagyobbak voltak, mint a fény hatásaként jelentkező eltérések (8. és 9. ábra összehasonlításában). A fény és a sötét kezelés hatása a rövid inkubációs idő (24 óra) mellett nem okozott számottevő különbséget a NRA-ban. Ez látszólag ellentmond a fény NRA indukáló szerepének, amely transzkripciós és poszttranszlációs szinten egyaránt megnyilvánul. A fény hiányával szembeni megvilágítás NRA fokozó hatásának elmaradása a rövid inkubációs idővel magyarázható. A növények a fotoszintézis napi periodicitásának megfelelő program alapján napi ciklusokban szabályozzák a NRA váltakozását. Ezért a napi rendszeres fotoperiódustól eltérő megvilágítási viszonyok csak hosszabb időtartam után

jelentkeznek a NRA-t befolyásoló hatásként, mint arról több kutató is (Pilgrim *et al.*, 1993.; Redinbaugh *et al.*, 1996; Lillo *et al.*, 2001.) beszámol.

A NRA a 12 órás vizsgálat során a kiinduló érték 3,4-3,5-szörösére emelkedett. Ez felhívja a figyelmet a NRA mérés minden alkalommal szükségszerűen azonos mintavételi időpontjának fontosságára. A mintavételt a napnak abban a szakaszában célszerű végezni, amikor a NRA várhatóan a legnagyobb értéket mutatja, hogy a kezelések közötti NRA különbségek így jól mérhető eltéréseket adjanak.

4.1.2.3. A nitrátreduktáz kinetikai jellemzése

Különböző nitrát koncentrációk mellett két különböző klorát tartalmú (3 mM és 7 mM) és klorátmentes kezelések hatását vizsgáltuk a NRA-ra. Eredményeinket a linearizált enzimkinetikai összefüggésben, $1/v_0 = 1/S$ függvényként ábrázoltuk (ld.10. ábra), mely alapján grafikusan meghatároztuk K_m és V_{max} kinetikai állandókat és kiszámítottuk a két klorát gátlás K_i értékeit (ld.10 táblázat). A klorát koncentráció növelése nem befolyásolta V_{max} értékét, K_m értékei viszont emelkedtek, ami alapján arra következtetünk, hogy a klorát gátló hatása kompetitív. Ez összhangban van a nitrát-klorát együttes hatására a növények fiziológias állapotában jelentkező megváltozásával, a klorotikus tünetek megjelenésével. A NRA klorát érzékenység alapján történő minősítésénél figyelmet kell fordítani arra, hogy az adott klorát koncentráció mekkora nitrát koncentráció mellett kerül alkalmazásra. A NRA klorát kezelés hatásaként is minősíthető, a nitrát koncentráció kísérleti körülményekben meghatározott pontos és állandó értéken tartásával.

A NRA időbeni lefutását vizsgáltuk nitrátmentes és nitrát tartalmú táptalajon nevelt kalluszcsoportokból származó mintákban. Mindkét esetben a NRA maximális értékeit 24 óra nitrát inkubáció után mértük.(ld. 11. táblázat). Azt tapasztaltuk, hogy a mérésorozat előtt közvetlenül egyforma nitrát indukcióban részesült kalluszcsoportok közül a magasabb NRA értékeket a nitrátmentes, AA táptalajon tenyésztettek mutatták (ld.11. ábra). A folyamatos tenyésztésben nitrátban részesülő (MS táptalaj) kalluszcsoportokra a mérést megelőző 15 mM KNO_3 adása nem fejtett ki olyan mértékű indukciós hatást, mint a nitrát hiányában szaporodókéra. Következtetésünk szerint a szubsztrátja állandó jelenléte miatt folyamatosan működő enzimre a nitrát adag közel megkétszerezése – a MS táptalaj nitrát tartalma 18,8 mM – nem fejt ki jelentős indukciós hatást. A nitrát hiányában inaktív enzimfunkció nitrát

adásával hirtelen és nagy mértékben felerősödik a nitrátmentes AA táptalajon tenyésztett kalluszok esetében. A NRA időbeni változását csillapodó hullámgörbével ábrázoltuk. A csillapodás az indukciós hatás megszűntét, a NRA kiindulási szintre visszatérését jelzi. A görbék minimum helye, a NRA időszakos csökkenése, arra utal, hogy az enzim működés eredményeként felszaporodott nitrát redukció termékei (nitrit, ammónia, glutamin) továbbalakulásukig, (aminosavak bioszintézise) gátló hatást gyakorolnak a NRA-ra. A redukált N-metabolitok fokozatos felhasználódásával koncentrációjuk lecsökken, és megszűnik gátló hatásuk. Ezért a NRA ismét emelkedik, a nitrát csökkenő indukciójának megfelelő kisebb mértékben, míg végül a kiindulási szintre tér vissza.

Az enzimaktivitás időbeni változásának eredményei alapján azt a következtetést vonjuk le, hogy érzékeny, nagy pontosságú és jól reproduálható NRA mérést nitrátmentes tápközegben nevelt, majd nitrát kezelésben részesült növényi anyagból, a nitrát indukciót követő 24 óra elteltével célszerű végezni.

4.1.3. A klorát toxikus tünetegyüttes, klorát teszt

A klorát a NR hatására klorittá redukálódik. A klorit a növény fejlődését, anyagcserefolyamatait gátolja, ami toxikus tünetekben nyilvánul meg. A toxikus tünetek növényi szövetek károsodásában megmutatkozó hatása a következő sorrendben jelenik meg.

1. A tünetek megjelenése mindig a legutolsó levélen kezdődik.
2. Az első tünet mindig a levelek elhajlásában észlelhető.
3. A tünetek a levél csúcsától a töve felé terjedtek, és fokozatos sárgulásban, barnulásban, elszáradásban nyilvánultak meg.
4. Végző állapotukban a levelek teljesen lehajlottak és elszáradtak.

A klorátos kezelések következményeként jelentkező toxikus tünetek értékelése (ld.12. táblázat) azt mutatja, hogy a klorát koncentráció növekedése fokozott hatással járt (1. és 2. kép). Másrészt, ugyanakkora klorát koncentrációjú tápközegben növekvő nitrát tartalom hatására a klorotikus tünetek kisebb mértékben jelentek meg (3. és 4. kép), egy határon túl nem is voltak tapasztalhatóak. Mindezekből azt a következtetést

vonjuk le, hogy, a nitrát koncentráció fokozódásával a klorát-klorit redukció visszaszorul, a klorát hatására bekövetkező mérgezés és annak megnyilvánulása nem a tápközeg klorát koncentrációjától, hanem a nitrát-klorát aránytól függ.

A glutamin jelenlétében a toxikus tünetek jelentős csökkenését vagy elmaradását tapasztaltuk. Ez alapján arra következtetünk, hogy a glutamin NRA gátlása miatt a nitrát redukciójának hiánya mellett nem történik meg a klorát redukciója sem, és klorit képződés hiányában a növények fejlődésében nem mutatkozik rendellenesség.

A különböző nitrát-klorát-glutamin koncentrációk kombinációi hatásaként tapasztalt tünetek rendszerezésével a NRA különbségek minősítési módszereként klorát toxicitási tünetegyüttes vizsgálatán alapuló szemikvantitatív tesztet dolgoztunk ki. A vizsgálat érzékenységének maximalizálása és a jó reprodukálhatóság, mint elsődleges szempontok figyelembevételével meghatároztuk a hidropóniás nevelés körülményeit, a tápoldat hatóanyagainak mennyiségét valamint az értékelés időpontját és módszerét. Ezek a következők:

1. A vizsgálati anyag magjainak felszínsterilizése 2%-os NaO'Cl-ben folyamatos 20 perces rázással, majd 3-szori csapvizet öblítés.
2. Csíráztatás nedves szűrőpapírok között fóliával lezárt Petri-csészében, sötétben 3 napig.
3. A csíranövények hidropóniás nevelése csapvízen 2 napig.
4. A csíranövények hidropóniás nevelése nitrátmentes tápoldaton a 2. levélkezdemény* megjelenéséig (kb. 3-4 nap).
5. A NR indukciója 0,4 mM KNO₃ tartalmú tápoldaton 24 órán át.
6. Klorát kezelés a tápoldat 7 mM KClO₃ kiegészítésével 3 napig, majd az oldat lecserélése ugyanolyan összetételű frissre.
7. A toxikus tünetek minősítése, értékelése a klorát kezelés 6. napján** a levelek állása és állaga-elszíneződése alapján.

*A növények genomtól függő egyedfejlődési ütemében tapasztalt kisebb különbségek miatt nem időponthoz, hanem fejlődési állapothoz rendelt.

**Bár eredményeink 8 napos klorát kezelés hatását mutatják (1., 2., 3. és 4. kép) a reprodukálhatóság szempontjából a 6. nap utáni minősítést tartjuk megfelelőnek.

A transzgenikus növények klorát tesztjét (22. táblázat és 17. kép) ez alapján végeztük.

4.2. A búza genetikai transzformációja

4.2.1. A genotípus kiválasztása és az explantátum eredete

A genetikai transzformáció hatékony működése érdekében alapvető fontosságú egy megbízhatóan működő növény-sejt–növény *in vitro* rendszer előzetes megalkotása. Ez magában foglalja a megfelelő genotípus jó dedifferenciálódó és regenerációs képességű explantátumának kiválasztását, valamint az optimális tenyésztési körülmények meghatározását.

Az előzőekben végzett búza sejt- és szövettenyésztési kísérleteink eredményei alapján választottuk ki azokat a genotípusokat, melyek szövettenyészthetőségi tulajdonságaiknak összehasonlításával kívántuk megjelölni a transzformációs kísérletsor legmegfelelőbb alanyát. A vizsgált négy genotípus három tulajdonsága alapján (ld. 14. táblázat) arra a következtetésre jutottunk, hogy a korábban szomatikus szövettenyésztési célra szelektált genotípus (Felföldi és Purnhauser, 1992.) szerepelt mindhárom értékmérő tulajdonságra nézve a legjobb eredménnyel. Ezért géntranszformációs munkánkhoz a CIMMYT No.45 tavaszi búza CY-45 szövettenyésztett vonalát használtuk. A tavaszi jelleg külön előnye volt, hogy a vernalizáció elkerülésével felgyorsította a transzgenikus kísérletek *in vivo* szakaszát.

A géntranszformációs kutatások sikeressége többnyire genotípus függő és az explantátum eredete is jelentősen befolyásolhatja. Az irodalmi források különböző kutató csoportok azonos genommal végzett kísérleteiről számolnak be. Így az első sikeres búza transzformációs kísérletek óta használják a Bobwhite (Weeks *et al.*, 1993.; Campbell *et al.*, 2000.) és ugyancsak hosszú ideje a Florida (Becker *et al.*, 1994.; Rasco-Gaunt *et al.*, 2001.) fajtákat. A kutató csoportok nagy része a szkutellumból indított sejttenyészeteket részesítik előnyben (Bommineni *et al.*, 1997.; Rasco-Gaunt *et al.*, 1999.; Zhang *et al.*, 2000.).

Az explantátum leghatékonyabban *in vitro* működő forrásának kiválasztásához kalászkából, embrióból és szkutellumból egyaránt indítottunk tenyészeteket. Úgy találtuk, hogy az embrió eredetű tenyészetek közül a legkorábbi fejlődési állapotúak szerepeltek a céljainknak leginkább megfelelően (ld. 6. és 7. kép). Nem találtunk jelentős különbséget az embriók és szkutellumuk között az előnyösebb szövettenyészthetőség tekintetében. A korai érési állapotú embriók a leginkább

alkalmasak a dedifferenciálódásra, jól szaporodó kalluszsövetek tenyésztésére. Transzformációs kísérleteink sejttenyészetét ezért éretlen embrió eredetű explantátumokból nyertük.

A szövettenyésztés egyéb paramétereinek beállításához a régebbi kísérletek során bevált gyakorlatot követtük. A tenyészetek tápközegeként a sejttenyészet indukciójához a 2 mg/l 2,4-D, növényregenerációra a 1-1 mg/l ZEA és IES, az *in vitro* növények gyökereztetésére pedig a 0,1 mg/l IES hormon tartalmú MS táptalajok megfelelőnek bizonyultak. Az alkalmazott hormon koncentrációk közül a 2,4-D dózist tartjuk a leginkább kritikusnak. A magas 2,4-D koncentráció a sejtburjánzásnak kedvez, viszont csökkenti a sejtek regenerációs hajlamát, az alacsony – ezzel ellentétesen – a sejttömeg kismértékű szaporodása mellett nagyobb regenerációs hatékonyságot tesz lehetővé. A búza *in vitro* sejttenyésztési kutatások előrehaladtával a 2,4-D hatását széles koncentráció tartományban (0,5-8,0 mg/l) megvizsgálva a 2 mg/l 2,4-D koncentráció alkalmazását tartják optimálisnak (Zhang *et al.*, 2000.).

4.2.2. Géntranszformáció

4.2.2.1. A gének bevitele

A génbevétel hatékonysága tapasztalataink szerint három alapvető tényezőtől függ. Meghatározó szerepe van az idegen gének vektor(ok)ba építési módjának, a transzformálandó sejtek életkorának és kondíciójának, valamint a génbevétel technikai paramétereinek..

Több idegen gén bevitele esetén, ha azokat egy vektorba építik, bármelyik expressziója nagy valószínűséggel a többi integrálódását is jelenti. A több gén egy vektorral történő bevitelének gátat szab a vektor maximális mérethátára, mely a gyakorlati tapasztalatok szerint 6-8 ezer bázispár. Ha mindegyik gént egy-egy vektorba építik be, bejuttatásuk során – kisebb méretük miatt – a sejtek kevésbé károsodnak, sikeresebb a regenerációjuk, viszont kisebb valószínűségű az összes transzformált gén egy sejten belüli megjelenése. A búza genetikai transzformációjához a legelső sikeres kísérletektől kezdődően a jelen kutatásokig a *gus* riporter gént és a *bar* szelekciós marker gént használják (Weeks *et al.*, 1993.; Becker *et al.*, 1994.; Witrzens *et al.*,

1998.; Rasco-Gaunt *et al.*, 1999.; Zhang *et al.*, 2000.; Massiah *et al.*, 2001.). A két gént vagy külön vektorba építve (Lamacchia *et al.*, 2001.), vagy többnyire a pAHC25 bináris vektorral (Ingram *et al.*, 1999.; Rasco-Gaunt *et al.*, 1999.; Rooke *et al.*, 2000.; Massiah *et al.*, 2001.) juttatják be a sejtekbe. A hasznos gén bevitele külön vektorral történik. Transzformációs kísérleteinket a pAHC25 és a pRT101 vektorok kotranszformációjával végeztük. A két plazmid által hordozott génekészlet beépülése nem volt egységes. A *bar* gén beépülését jelző, PTT rezisztens 6 vonal (ld. 16. táblázat) közül csak 2 vonal mutatta a *cnx1* hiányára utaló csökkent NRA-t (ld. 19. táblázat). Következtetésünk szerint ennek oka lehet az is, hogy a két plazmid ugyanazon sejtbe bekerülésére nem lehet teljes biztonsággal számítani. Mindezt alátámasztják azok az irodalmi adatok (Zhang *et al.*, 2000.), melyek különböző kotranszformációval bejuttatott géneknek a marker génekhez képest eltérő hatékonyságú megnyilvánulásáról számolnak be.

A génbelövésen alapuló első sikeres kísérleti eredmények (Weeks *et al.*, 1993.; Becker *et al.*, 1994.) a néhány napos, fiatal embrió eredetű kallusz belövését javasolták. Kísérletünkben különböző életkorú kalluszokat használtunk, hogy meghatározzuk a sejtenyészetek alkalmazhatóságának idő korlátait. Eredményeink azt mutatják (ld. 15. táblázat), hogy az 5, 10 és 15 napos korban belőtt kalluszok között nem állapítható meg a szelektált kalluszok száma alapján lényeges különbség. Az idősebb kalluszok esetében a szelekciós nyomás okozta különbségek kisebbek voltak, ezért a szelekció hatékonysága jelentősen csökkent. Ennek alapján a két hétnél idősebb kalluszok belövését célszerű elkerülni.

A gének belövésének sikerességét a *gus* gén hatásaként, a sejtek hisztokémiai megfestődése jelzi (ld. 9. ábra). Ez megmutatja hogy az új géneket hordozó plazmidok milyen eloszlásban és gyakorisággal kerültek be a sejtekbe. A riporter gén jelzése támpontul szolgál a génpuska használatának módosításához, a génbelövés technikai paramétereinek pontosításához. A génpuska technikai beállításait a felhasználói utasításokkal megegyezően alkalmaztuk, ami megegyezett az irodalmi adatokkal (Ingram *et al.*, 1999.; Rasco-Gaunt *et al.*, 1999.). Több előkísérlet alapján (nem közölt adatok) – a GUS festés mintázatait összehasonlítva – a célsejtek és a belövésre váró plazmid hordozó közötti távolságot, mint legmegfelelőbbet, 12 cm-re állítottuk be.

4.2.2.2. A transzformáció vizsgálata *in vitro*

A sikeres transzformáció eredményeként a beépült gének működőképessége a marker gén expressziójával becsülhető. Ezt egyrészt a marker gén hatására termelődő enzim kimutatásával, másrészt az enzimműködés eredményeként nyilvánuló herbicid rezisztencia vizsgálatával ellenőriztük. A PAT enzim kromatogramja alapján egyértelműen következtethetünk a *bar* gén működésére.

Az enzimműködés kimutatása biolaphos herbicid tartalmú táptalajon *in vitro* szelekcióval történt. Eltérő adatokat közöl a szakirodalom a szelekciós nyomás nagyságára, azaz a herbicid hatóanyag koncentrációjára és az *in vitro* szelekció időintervallumára vonatkozólag. Az alacsony hatóanyag koncentrációt és a rövid szelekciós időt a kalluszsövet regenerációs képességének megőrzése, és így vélhető nagyobb transzformációs hatékonyság érdekében javasolják (Weeks *et al.*, 1993.; Becker *et al.*, 1994.; Bommineni *et al.*, 1997). Munkánk kezdetén, az ismert közlemények alapján mi is alacsony 1 mg/l biolaphos dózist használtunk, ami nagyszámú feltételezett *bar* transzgénikus sejt vonal túléléséhez vezetett. Ezek a későbbi (*in vivo*) szelekció során herbicid érzékenyeknek bizonyultak, azaz az alacsony dózis miatt nagy számban dolgoztunk olyan kalluszokkal, amelyek ún. megmenekült kalluszosok voltak. Későbbi kísérleteink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a 3-5 mg/l biolaphos dózis szükséges a sikeres *in vitro* szelekcióhoz.. Az újabb kutatások eredményei ezt megerősítik (Zhang *et al.*, 2000; Pastori *et al.*, 2001).

Az irodalmi adatoktól eltérően, (Vasil *et al.*, 1992.; Weeks *et al.*, 1993.) munkánk során viszonylag hosszú (6-8 hónap) szelekciós szakaszt alkalmaztunk. Ennek eredményeként nagy számú kalluszt kaptunk, melyből regenerált növények többsége herbicid rezisztens volt. Ezért a hosszú szelekciós ciklus fontosságát bizonyítottnak látjuk. Az első, transzgénikus búzáról beszámoló tudományos közlemények (Vasil *et al.*, 1992.; Weeks *et al.*, 1993.; Becker *et al.*, 1994.) esetében a gyors és hatékony növényregenerációra fordítottak nagyobb gondot. Ezért a szerzők megítélésünk szerint nem fordítottak elegendő időt a szelekcióra. Ebből adódhat, hogy kísérleteinkben lényegesen alacsonyabb volt a szelektált kallusz- és transzgénikus növény-előállítási gyakorisága, mint a mi esetünkben.

4.2.2.3. A transzformáció vizsgálata *in vivo*

Az *in vitro* PAT⁺ kalluszokból nyert transzformáns növények akklimatizálását követően elvégzett herbicides permetezés (0,1 %-os bialaphos) nem károsította *in vivo* a növényeket. Mindegyik sejt szinten PAT aktivitást mutató egyed megőrizte herbicid rezisztenciáját üvegházi növényként is.

A *bar* transzformációs kísérlet eredményei (ld. 15. táblázat) azt mutatják, hogy a belőtt kalluszok 0,5 %-a bizonyult PPT rezisztensnek, melyek 2/3-ából volt kimutatható a PAT enzim jelenléte. Ez utóbbiak feléből sikerült növényt regenerálni, melyek 60 %-a (6db növény) fertilis volt. Az eredményeket értékelve úgy véljük, hogy a kis számú rezisztensként szelektált kallusz oka a magas koncentrációjú és hosszú időtartamú szelekciós nyomás. Szintén a hosszú idejű sejt szintű tenyésztéssel magyarázzuk a regeneráció 50 %-os hatékonyságát. Az idegen gén integrálódása a generatív tulajdonságok romlásával járt együtt, amivel a fertilis növények kis arányát magyarázzuk.

4.2.3. A transzgének vizsgálata az utódnemzedékekben

A hat fertilis egyedet öntermékenyítéssel továbbszaporítottuk, és az utódgenerációt vizsgáltuk a PTT rezisztencia öröklődése, a *cnx1* hiányára utaló NRA csökkenése és ezzel összefüggésben az utódok klorát érzékenysége/rezisztenciája vonatkozásában.

4.2.3.1. A foszfinotricin rezisztencia öröklődése

Foszfinotricin totális gyomirtószerrel permetezve az utódok átlag 75 %-a volt rezisztens (ld. 16. táblázat). Ez arra utal, hogy a *bar* gén az utódnemzedékben 3:1 arányban hasadt (ld. 14. kép). Ebből következik, hogy a *bar* gén a mendeli öröklésment szerinti egygénes beépülésű, és domináns öröklődésű. Ez megfelel a rezisztencigének elvárható, minőségi tulajdonságkénti öröklődésének.

4.2.3.2. Csökkent nitrátreduktáz aktivitás megjelenése

A *bar* génre transzgénikusnak talált hat növényegyedből indított vonalak T₁ nemzedékét a *cnx1* gén antiszenz megnyilvánulását keresve vizsgáltuk tovább. A minták NRA értékei azt mutatják (ld. 17. és 19. táblázat), hogy a hat vonal közül kettő (a 117 és a 124) mutat szignifikáns NRA csökkenést. Következtetésünk szerint a többi vonal esetében a kotranszformáció hatékonysága lényegesen alacsonyabb volt. A *cnx1* antiszenz gén öröklődésének ellenőrzéséhez további vizsgálatainkat ezért ezzel a két vonallal végeztük.

A 117 és 124 vonal T₂ növénynemzedékek valamint a növényekkel azonos sejt eredetű és korú kallusztenyészetek NRA eredményeit hasonlítottuk össze (ld. 21. és 23. táblázat). Azt találtuk, hogy a kalluszok NRA szintje szignifikánsan meghaladta (P = 10 % és P = 5 % szinten) a növényi szövetekből mért NRA értékeket. Valószínűnek tartjuk, hogy az anyagcserefolyamatok zavartalansága a sejt kultúrák szintjén egy hatékonyabb készenléti állapotot, az enzimaktivitások magasabb értékeit igényli. Ennek megfelelően indokoltnak véljük, hogy NRA értékei tendenciózusan nagyobbak adódtak a kalluszsövetekből mérve a növényminták NRA értékeihez képest.

A genotípusok között a NRA értékekben csak a P = 10 % szinten volt különbség. Kallusz szinten a két transzgénikus vonal egyedeinek NRA csökkenése nagyobb, mint a növényi szövetből mértéké. A T₂ nemzedékben a 124 vonal nagyobb mértékben mutat NRA csökkenést, mint a 117, melynek NRA értéke a kontroll CY-45-höz közelít. A T₁ nemzedékhez képest a NRA magasabb értékeket mutat a két transzgénikus vonal esetében. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a *cnx1* antiszenz jelenlétére utaló NRA csökkenés a T₂ nemzedékben nem szignifikáns, a transzgén átöröklése heterogén, nem minden esetben történt meg.

4.2.3.3. A klorát kezelés hatása a transzgénikus utódnemzedékre

A NR enzim működés ellenőrzésére a 117 és 124 vonal T₂ nemzedékén végeztük el a klorát tesztet. A teszt értékeléséből (ld. 22. táblázat) megállapítható, hogy a 117 vonal egyedei kevésbé viselték el a klorát kezelést, nagyobb mértékben mutatták a toxikus tünetegyüttes fokozottabb mérgezésre utaló jellemző jegeit, mint a 124 vonal egyedei. A kontroll CY-45 növényekhez képest mindkét vonal esetében nagyobb

klorát toleranciát tapasztaltunk. A kezelés hatásaként a tünetek megnyilvánulásában jelentkező legnagyobb heterogenitást a 117 vonal egyedeinél észleltük. A 124 vonal egyedeinél nagyfokú homogenitást tapasztaltunk, mint azt a reprezentatív minták összehasonlítása is mutatja (ld. 17.kép).

A klorát teszt eredményei arra engednek következtetni, hogy a NRA a 117 és a 124 vonalban alacsonyabb szinten nyilvánul meg, mint a CY-45 kontrollban. A két transzgénikus vonal T₂ utódnemzedékében fellelhetőek a *cnx1* antiszenz transzgén megnyilvánulását a NR csökkent működésével jelző egyedek. A 117 vonal klorát toxicitásban mutatott heterogenitása a transzgén nagyfokú szegregációjára utal. A 124 vonal esetében a transzgén hatása egységesebb és kifejezettebb.

ÖSSZEFOGLALÁS

A búza az egyik legfontosabb gazdasági növényünk. Több, mint 60 országban a népelelmezés fő terménye, a napi kalóriabevitel 10-20 %-át biztosítja. Ezért a búza az egyszikűek fiziológiai, biokémiai és genetikai kutatásának egyik fontos modellnövénye.

A búza minőségének javítása és termésmennyiségének növelése, új, előnyösebb tulajdonságú fajták bevezetésével, mindeddig főképpen a klasszikus növénynemesítés módszereivel történt. A nemesítési törekvéseknek gyakran gátat szab, hogy csak a meglévő, behatárolt génállomány kiaknázására van lehetőség. A modern biotechnológiai eljárások fejlődésével, a közvetlen génbevitel a meglévő génkészlet változatosságának kibővítésével teszi lehetővé a növénynemesítés hatékonyságának növelését. A szövettenyésztés és a rekombináns DNS technika alkalmazása új genetikai tulajdonságokkal rendelkező transzgenikus növények nagy számát eredményezi.

Munkánkban búza genetikai transzformációját végeztük a nitrátreduktáz gén módosítása és vizsgálata céljából.

Mivel a nitrátreduktáz *cnx1* antiszenz gén bevitelét tűztük ki feladatul, munkánk első részét a nitrát asszimiláció metabolizmusának tanulmányozása jelentette. Vizsgáltuk a nitrát, a klorát és a glutamin hatását a nitrát felvételére és redukációjára. Kísérleteink tárgyát képezte a fény és a napi ciklus NR szabályozására gyakorolt befolyása. Mértük a NRA változását az idő függvényében, és meghatároztuk az enzimreakció kinetikai paramétereit, valamint a klorát gátlásának típusát. A NRA szintjének ellenőrzésére tesztet dolgoztunk ki, amely a klorát toxicitás tüneteinek megfigyelt és regisztrált különböző megjelenésén alapszik.

A nitrát hatással van saját felvételére, de mennyiségével nem arányos mértékben. A nitrát külső koncentrációjának 5-szörösére emelése csak 1,3-szoros növekedést okozott annak felvételében. Úgy véljük, hogy a nitrát felvétele telítési kinetika által szabályozott, minden bizonnyal a HATS-on keresztül. Ugyanez a tendencia volt tapasztalható a nitrátnak NRA-ra gyakorolt hatásaként is, de nitrát hiányában a NRA nem volt mérhető.

A klorát kezelés hatása különbséget mutatott a nitrát felvétele és redukciója tekintetében. Bár a növekvő külső klorát koncentráció egyaránt csökkentette a nitrát felvételét és a NR aktivitást, a gátlás vélhetőleg csak egy koncentráció határ felett hatásos a Nrt-re. A NR gátlása viszont nem önmagának a klorát hatásának, hanem a klorát/nitrát aránynak tulajdonítható. Ebből következően úgy véljük, hogy a klorát nem képes átjutni a plazmamebránon a Nrt nitrát indukciója hiányában, és transzportja a LATS-on keresztül történik. Ami a NRA-t illeti, a klorát a NR redukáló hatásáért vetélkedő nitrát külső mennyiségétől függően képes hatni.

A glutaminról azt találtuk, hogy a nitrát felvételét és redukcióját is gátolja. Nagy koncentrációban elsősorban a transzport rendszerre hat, másodsorban a NRA-t csökkenti. Ezek a hatások a klorát koncentrációtól függetlenül érvényesülnek. Vélhetően a glutamin a nitrát asszimilációt más módon szabályozza, mint a klorát. Ez az enzim egy másik helyén történik, és arra enged következtetni, hogy a glutamin gátló hatása a nitrát asszimilációt feed back módon szabályozza. Feltételezésünk szerint hatása a nitrát felvételére nagyobb, mint redukciójára. Az egyforma külső glutamin tartalom melletti nitrát felvétel csökkenéséhez képest nagyobb NRA csökkenés a kisebb mennyiségben bejutott nitrát csökkent indukciós hatásának is köszönhető.

A fény hatásaként a NRA növekedését figyeltük meg a megvilágítás időtartamának emelkedésével. Nem tapasztaltuk, hogy a 24 órás sötét kezelés NRA csökkenést okozott volna akár a növényi szövetek akár a kalluszok esetében. Ezért úgy véljük, hogy a fény rövid időtartamú hiánya nem okoz zavart a növények napi fiziológiás működésében, és követik a ciklikus ritmus változásait.

Megmértük a NRA változását különböző szubsztrát koncentrációk függvényében klorát jelenlétében és anélkül, majd meghatároztuk a K_m és V_{max} értékeit a klorát gátlás típusának megítélésére. A V_{max} értékek közel azonosak voltak mindkét különböző klorát kezelés (3 mM és 7 mM) esetében, akárcsak klorát nélkül, de a K_m értékek különböztek. A növekvő klorát hatás nagyobb K_m értéket eredményezett, ami arra utal, hogy minél több a klorát, annál gyengébben kötődik a szubsztrát. Ebből következően a klorát a NR működésére kompetitív inhibitorként hat.

Különböző időpontokban meghatároztuk nitrátos táptalajon és nitrát hiányos táptalajon nevelt kallusztenyészetek NRA-át 24 órás nitrát indukciót követő nyolc napos időtartamban. A görbék, melyek a NRA változását az idő függvényében tüntetik fel, csillapodó hullámvonal lefutásúak. A nitráton és a nitrát hiányában nevelt kallusztenyészetek ugyanabban az időpontban mért NRA értékei különböztek

egymástól. Feltételezhető, hogy a két görbe közötti különbség a NR túlműködésének tulajdonítható, ami abban az esetben nyilvánul meg, ha hosszú ideig nitrogén hiányában nevelt explantátumok táptalajába NR indukció céljából nagy dózisban nitrátot adnak, szemben az állandó nitrát ellátásban részesült mintákkal. A görbék hullám jellege annak köszönhető, hogy a nitrát redukció eredményeként felszaporodó N-metabolitok továbbalakulásukig gátolják a NR működését.

Egy teszt módszert dolgoztunk ki a NRA értékelésére. A módszer klorát kezelés hatásaként a növények fiziológiás állapotában bekövetkezett változásokon alapul. A klorát hatásának minősítésére a növények két tipikus tulajdonságának megváltozását választottuk. Az egyik a levelek elhajlásában, a másik a levelek szövet állományának változásában jelentkezik. A levelek állása alapján három (egyenes, elhajló és lehajlott), a szöveti változások alapján öt kategóriát (a klorózis mértékétől függően) állítottunk fel.

A búza nitrát asszimiláció vizsgálatának eredményeiből hasznos következtetéseket tudunk levonni a transzformációs kísérletsor pontos tervezéséhez. Ezeket az alábbiakban összegezzük:

1. A nitrátreduktáz indukciójához a nitrit elengedhetetlenül szükséges, de minimális mennyiségben elegendő.
2. Az egyidejű nitrát és klorát kezelés egymás hatását befolyásolja, ami kompetitív gátlás miatt a nitrát/klorát aránytól függ.
3. Ha a növénykéek tenyésztéséhez N forrásként glutamint használunk, tekintettel kell lenni annak Nrt és NR gátló hatására.
4. A napi ciklus szerinti változás miatt, az ugyanabban az időpontban történő mintavétel fontos paraméter a NRA meghatározás reprodukálhatósága szempontjából.
5. A NR nitrát indukcióját a növények hosszú idejű nitrát éheztetése után célszerű végezni, hogy a vizsgált minták között nagyobb különbségeket mérhessünk, és ezáltal megbízhatóbb adatokhoz jussunk.
6. A szemikvantitatív klorát rezisztencia teszt alkalmas módja búza csíranövények NRA szintjének meghatározásához.

Munkánk második részében, a nitrát asszimilációja terén szerzett ismeretekre is alapozva, búza genetikai transzformációját végeztük.

Mivel a növényi szövettenyésztés, és ebből következően a géntranszformáció is, nagy mértékben genotípus és explantátum függő, a transzformációs kísérletsor előtt meghatároztuk a céljainknak leginkább megfelelő búza genotípust és explantátumot. Négy genotípus szövettenyésztési tulajdonságait, az embrióképzésre mutatott hajlamukat, kalluszosodó képességüket és a növényregeneráció hatékonyságát hasonlítottuk össze. Az embrióképzésben leggyengébb, kalluszosodásban a legjobb eredményt mutató és megfelelő regenerációs képességgel rendelkező tavaszi típusú CY-45 vonalat választottuk ki transzformációs kísérleteinkhez.

A kiindulási alapanyagul szolgáló explantátum kiválasztására virágzó kalászból izolált embriókat vizsgáltunk. Az éretlen embriókból indított sejt proliferáció bizonyult a leghatékonyabbnak. A kalluszsövetek négyszeri átpasszálás után is megőrizték regenerációs készségüket.

Az idegen gének bejuttatása a pAHC25 és a pRT101 vektorok kotranszformációjával történt. A pAHC szelektív markerként foszfinotricin (PPT) herbicid rezisztenciát képviselő *bar* gént, jelölőként pedig β -glükuronidáz kódozó *gus* gént tartalmaz. A plazmid működése a kukorica ubiquitin promóter ellenőrzése alatt áll. A pRT101 a NR MoCo szintézisében a molibdén pterin vázba beépüléséért felelős *cnx1* gént tartalmazza antiszenz formában. A géneket a CaMV 35S promóter hajtja meg.

A belőtt kalluszokat 6-8 hónapig öt hetenkénti passzálassal 5 mg/ml bialaphos tartalmú táptalajon tenyésztettük. A *bar* gén megnyilvánulását, a foszfinotricin hatását túlélő sejtek mutatták. Az idősebb kalluszok esetében a szelektív nyomás okozta különbségek kisebbek voltak, ezért a szelekció hatékonysága jelentősen csökkent. Ennek alapján a két hétnél idősebb kalluszok belövését célszerű elkerülni.

A *bar* gén megnyilvánulását a PAT enzim kromatogramja alapján ellenőriztük. A rezisztens kalluszokból tíz növénykét sikerült regenerálni, melyek a PAT teszt alapján mind foszfinotricin rezisztensnek bizonyultak. Az öntermékenyítéssel továbbszorított növényekből hat herbicid rezisztens vonalat kaptunk.

A T₁ utódnemzedékben a *bar* gén 3:1 arányban hasadt, ami azt mutatja, hogy a mendeli öröklésment szerinti domináns öröklődésű.

A T₁ nemzedék hat PTT rezisztens vonala közül kettőben tapasztaltunk a *cnx1* antiszenz gén integrálódására utaló szignifikáns NRA csökkenést. Ez azt mutatja, hogy

a *bar* gén átvittele mellett nem volt mindegyik esetben sikeres a kotranszformáció. A T₂ nemzedékben a két vonal esetében a NRA magasabb értékeket mutatott a T₁ nemzedékhez képest. A transzgén átöröklése heterogén, nem minden esetben történt meg.

A *cnx1* antiszenz transzgén megnyilvánulását a T₂ nemzedékben klorát teszttel is vizsgáltuk. A két T₁ nemzedékben csökkent NRA-t mutató vonal közül a 117 vonal egyedei kevésbé viselték el a klorát kezelést, mint a 124 vonal egyedei. Ugyanakkor a kontroll CY-45 növényekhez képest mindkét vonal esetében nagyobb klorát toleranciát tapasztaltunk. A klorát teszt eredményei arra engednek következtetni, hogy a NRA a 117 és a 124 vonalban alacsonyabb szinten nyilvánul meg, mint a CY-45 kontrollban. A két transzgenikus vonal T₂ utódnemzedékében fellelhetőek a *cnx1* antiszenz transzgén megnyilvánulását a NR csökkent működésével jelző egyedek. A 117 vonal klorát toxicitásban mutatott heterogenitása a transzgén nagyfokú szegregációjára utal. A 124 vonal esetében a transzgén hatása egységesebb és kifejezettebb.

A genetikai transzformáció során szerzett tapasztalataink eredményeink és megállapításaink:

- Szövettenyésztési tulajdonságait tekintve a CIMMYT No.45 tavaszi búza CY-45 *in vitro* vonala jó hatékonysággal használható géntranszformációs kutatásokhoz.
- Az éretlen embrió eredetű szövettenyészetekből nagy mértékű sejt szaporodás indukálható a sejtek regenerációs képességének megőrzése mellett.
- A foszfinotricin rezisztenciát kódoló *bar* gén expresszióját PAT teszttel bizonyítottuk.
- A *bar* gén integrálódását a T₁ nemzedékben megjelenő herbicid rezisztencia igazolja, ami egygénes domináns öröklődést mutat.
- A *cnx1* antiszenz gén hatásaként csökkent a nitrátreduktáz aktivitás szintje a T₁ nemzedékben.
- A T₂ nemzedékben a *cnx1* antiszenz gén szegregációja miatt a nitrátreduktáz aktivitás nem mutatott egységes szignifikanciát.
- A T₂ nemzedék egyedei közül több nagy fokú klorát toleranciát mutatott, ami a nitrátreduktáz alacsony szintjére utal.

SUMMARY

Wheat is one of the most important crops.. It forms a staple part of the diet in over 60 countries, being 10-20 % of the daily calorific intake. Therefore wheat is considered as an important model for physiological, biochemical and genetic studies in monocotyledonous species.

Until recently, classical plant breeding has mainly contributed to the developed quality and increased production of wheat by introducing new and improved varieties. However, breeding efforts are often constrained by the availability of only a limited gene pool for exploitation. The modern biotechnological approach of direct gene transfer is expected to supplement breeding efforts by expanding the diversity of the existing gene pool. Application of tissue culture and recombinant DNA technology results many transgenic plants with new genetic properties.

In our work we have performed the transformation of wheat in order to modify and investigate nitrate reductase gene.

Since the *cnx1* gene of nitrate reductase was assigned as the gene of interest, we have studied the nitrate assimilation pathway in wheat in the first part of our work. We have investigated the effect of nitrate, chlorate and glutamine on the uptake and the reduction of nitrate. The subject of our experiments were to study the influence of light and the daily cycle controlling NR. We have measured the changes in NRA by time and have determined the kinetic parameters of enzyme reaction and the inhibition type of chlorate. To control the level of NRA we have worked out a test, which is based on the different manifestation of chlorate toxicity symptoms have been observed and registered.

Nitrate acted uptake of itself but not in proportionally Increasing the nitrate external concentration up to 5 times caused increasing in its uptake only 1,3 times. It is suggested that the uptake of nitrate is controlled by saturation kinetic probably of the HATS. The same tendency was found investigating the effect of nitrate on NRA but we could not measured any activity when there was no nitrate in the medium.

The affects in chlorate treatments were different between the uptake and reduction of nitrate. Though increasing external chlorate concentration decreased both the uptake of nitrate and NR activity, the inhibition was effective only above a

concentration limit of chlorate on Nrt while NR was not repressed by chlorate itself but it is influenced by chlorate/nitrate ratio. That goes the suggestion that chlorate can not enter the plasma membrane without induction of Nrt by nitrate and its transport occurs via LATS. Considering the NRA, chlorate is able to act depending on the quantity of external nitrate content competes for NR to reduct.

Glutamin was found to inhibit nitrate uptake and reduction too. It affected at high level of concentration on the transporter system firstly and decreased NRA secondly. These effects acted with the concentration of chlorate independently. It is thought that glutamin control the nitrate assimilation pathway by an other way than chlorate influences it. It occurs at an other site of the enzymes and it is suggested that glutamin inhibits the nitrate assimilation system by feed back regulation. It is believed too that its effect is more expressed on the uptake than the reduction of nitrate and the bigger decreasing of NRA to compares to the decreased uptake of nitrate at the same external glutamin content is due to the super effect caused with the affect of less uptaken nitrate as inducer of NRA as well.

The increasing of NRA was observed when the time passed as effect of light by increasing the exposure time. We could not experience the decrease of NRA as an affect of growing plants or calluses in the dark for 24 hours. Thus it is proposed that the short period lack of light does not disturb the dailly phisiological cycle of plants and they follows the circadian rhythm.

We have measured the changes of NRA as the effects of different substrate concentrations with and without chlorate and determined the K_m and V_{max} values by direct linear plots to establish the type of chlorate inhibition. The V_{max} values were closely same in the case of the two different chlorate treatments (3 mM and 7mM) and without it but the K_m values differed. The increasing chlorate effect resulted the bigger value of K_m , which indicates the more chlorate the weaker bind of the substrate. It is suggested that chlorate acts as a competitive inhibitor on the function of NR.

The NRA values were determined in calluses cultured with and without nitrate in different times after 24 hours' nitrate induction during an eight's days period. The curves represented the change in NRA by time showed supressed wavy lines. There have been differences in NRA measuered at the same time depending on the presence or lack of nitrate in the medium cultured the callusses before the investigation. It is supposed that the difference of the two curves is attributed to the overexpression of NR in that case if there is no nitrate in the culture medium for a long

time before a big dose of nitrate is added to for induction of NR in contrast with the permanent nitrate supplied samples. The wavy type of the curves is thought to be due to the increasing N-metabolites as the results of nitrate reduction inhibited the function of NR till their conversion.

A test method has been worked out as a suitable valuation of NRA. It is based on the changes of the physiological condition of plants due to chlorate treatment. We have found two typical features in alteration of plants to qualify the effect of chlorate. One is the bend and the other is the substance of leaves. Three categories of position of leaves (straight, blended and fully blended) and five categories of their substances (depending on the degree of chlorosis) were established.

It can have been drawn useful conclusions from the results investigating nitrate assimilatory pathway in wheat for the exact planning of the transformation experiments. These are summarized as follows:

1. Nitrate is needed essentially but it is sufficient in a very little amount for induction of nitrate reductase
2. The simultaneous treatment with nitrate and chlorate influence on the effects of each other, which depends on the nitrate/chlorate ratio because of their competence in inhibition.
3. If glutamine is used as a N-source of culturing plantlets its inhibition effect on Nrt and NRA must be taken into consideration.
4. Taking samples at the same time is an important parameter for the reproducibility of determining NRA because of the circadian rhythm.
5. It is useful to perform the induction of NR by nitrate after a long time of nitrate starvation of plants in order to be able to measure bigger differences in values from the investigated samples and making more accurate data by this way.
6. The semiquantitative chlorate resistance test is available as a useful tool for determining the NRA level of plants

In the second part of our work, we have performed genetic transformation of wheat based on our knowledge too, which was obtained investigating of nitrate assimilation pathway.

As tissue culturing and genetic transformation as well depends on genotype and explant in high degree, the most suitable genotype of wheat and organ using as explant were decided before the transformation experiences. The features of four genotypes in tissue culturing were compared such as susceptibility to produce embryos, ability to form calli and efficiency of plant regeneration. A spring type line signed CY-45 was chosen because of its characters being the least in producing embryos, the best in formation of calli and having sufficient ability to regenerate plants for the transformation experiences of ours.

To find the organ using as explant embryos isolated from flowering ears were investigated. The cell proliferation originated from the culturing of embryos was found as the best one. The tissues of calli have retained the ability of regeneration even if they were recultured four times.

The transfer of foreign genes were executed by cotransformation of pAHC25 and pRT101 vectors. The pAHC25 contains the *bar* gene as selectable marker, which confers resistance to the herbicide phosphinothricin (PPT), and screenable *gus* gene, coding for β -glucuronidase both under the control of the maize ubiquitin promoter. The pRT101 contains the *cnx1* gene, which is responsible for the building up the pterin ring with molybdenum, in antisense formation. The genes are driven by CaMV 35S promoter.

The bombarded calluses were cultured in medium containing 5 mg/ml bialaphos for 6-8 months transferring on fresh medium in every fifth week. The *bar* gene was expressed in the cells survived the affect of phosphinothricin. The differences in the affect of herbicide were trifling in the case of elder calli, therefore the efficiency of selection decreased significantly. It is proposed to avoid bombarded calli older than two weeks.

The expression of *bar* gene was monitored on the chromatogram of enzyme PAT. We were succeed in regeneration of ten plantlets, which were resistance to phosphinothricin, on the basis of PAT test. These plantlets were propagated by self-pollination to constitute six herbicide resistance lines.

T₁ progeny lines fitted 3:1 ratio for the segregation of *bar* suggesting integration occurred in one locus and showing Mendelian dominant inheritance.

It was found two lines, which showed significant decrease in NRA, referring to the integration of *cnx1* antisens gene when the six PTT resistance lines of T₁ progeny were investigated. It is supposed that the cotransformation of the gene of interest with *bar* gene was not successful in all cases. The NRA values were higher in the T₂ progeny than in the T₁ progeny measured in both of the two lines. It is suggested that the inheritance of the gene of interest is heterogeneous not to realize in all of the cases.

The expression of *cnx1* antisense gene in T₂ progeny was investigated by the chlorate test too. We examined the behaviour of two lines which has shown significant decreased values of NRA towards chlorate. The plants of line signed 117 tolerated the chlorate treatment less than plants of line signed 124. Nevertheless both lines had bigger tolerance to chlorate than the wild type CY-45. On the evidence of the results it is thought that the level of NRA is lower in the 117 and 124 lines than in the wild type CY-45. One can find some individuals in T₂ progeny of the two transgenic lines, in which the *cnx1* antisens transgene is expressed indicating the decreased function of NR. The heterogeneity of 117 lines in chlorate toxicity indicates the segregation of the transgene in a high degree. The expression of transgene is much more effective and uniform in the case of the 124 line.

Experiences, results and findings to have got by genetic transformation in wheat:

- On the basis of its tissue culturing characters, the CY-45 *in vitro* line of CIMMYT No.45 spring wheat is useable in high efficiency as the genotype of genetic transformation.
- One can induce cell proliferation from tissue cultured cells in high degree originated from immature embryos while the regeneration ability of cells retains.
- The expression of *bar* gene encoding phosphinothricin resistance has been proved by PAT test.
- The integration of *bar* gene is proved by herbicid resistance manifested in the T₂ progeny indicating the inheritance in one locus
- The level of nitrate reductase activity decreased in the T₁ progeny by the effect of the *cnx1* antisens gene.
- The T₂ progeny had no uniformity in nitrate reductase activity because of the segregation of *cnx1* antisens gene.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm konzulensemnek Dr. Pauk János tudományos főmunkatársnak a lehetőséget, hogy szakmai irányításával munkám nagy részét a GK Kht Szövettenyésztő Laboratóriumában végezhettem. Köszönöm hasznos és értékes tanácsait, mellyel hozzájárult kísérleteim sikeres végzéséhez.

Hálás köszönettel tartozom Kótai Évának, Giláné Talpas Krisztinának, Kiss Orsolyának és Kispál Juditnak a laboratóriumi munkákban nyújtott gondos és körültekintő segítségükért.

Ezúton fejezem ki köszönetemet Dr. Avasi Zoltán és Hódiné Széll Margit munkatársaimnak a statisztikai elemzések elkészítéséhez nyújtott hasznos tanácsaikért.

Köszönettel tartozom Mihály Róbertnek a számítógépes képszerkesztésben nyújtott segítségéért.

Hálásan köszönöm családomnak, barátaimnak és munkatársaimnak mindazt az áldozatkészséget, mellyel feladataim részleges átvállalásával, nagymértékben elősegítették, hogy munkámat elvégezhessem.

- Aberg, B.* (1947): On the mechanism of the toxic action of chlorates and some related substances upon young wheat plants. *Annual Review of Agricultural College Sweden*, 15: 37-107.
- Alpeter, F.- Vasil, V.-Srivastava, V.- Vasil, I.K.* (1996): Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nature Biotechnology*, 14: 1155-1159.
- Alpeter, F.- Diaz, I.- McAuslane, G.- Gaddour, K.- Carbonero, P.- Vasil, I.K.* (1999): Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CME. *Molecular Breeding*, 5: 53-63.
- Aslam, M.- Travis-Robert L.- Rains, D.W.- Huffaker, R.C.* (1997): Differential effect of ammonium on the induction of nitrate and nitrite reductase activities in roots of barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 101: 612-619.
- Bachmann, M.- McMichael, R.W.- Huber, J.L.- Kaiser, W.M. - Huber, S.C.* (1995): Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Plant Physiology*, 108: 1083-1091.
- Bachmann, M.- Shiraishi, N.- Campbell, W.H.- Yoo, B.C.- Harmon, A.C. - Huber, S.C.* (1996): Identification of Ser-543 as the major regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell*, 8: 505-517.
- Barabás, Z.*: A búzatermesztés kézikönyve. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1987.
- Barro, F.- Rooke, L.- Békés, F.- Gras, P.- Tatham, A.S.- Fido, R.- Lazzeri, P.A.- Shewry, P.R.- Barcelo, P.* (1997): Transformation of wheat high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnology*, 15: 1295-1299.
- Barsby, T.L.- Bervas, E.- Coates, S.- Freeman, J.P.- Weir, A.F.* (1999): Significant alteration of wheat starch by transgenesis. In: Abstracts Book, Genetic Tailoring of Novel Starch Polymers. Carry-le-Rouet, France
- Barton, K.A.- Binns, A.N.- Matzke, A.J.M.- Chilton, M.D.* (1983): Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA to R1 progeny. *Cell*, 32: 1033-1043.

- Becker, D.- Brettschneider, R.- Lörz, H.* (1994): Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal*, 5: 299-307.
- Becker, T.W.- Foyer, C.- Caboche, M.* (1992): Light-regulated expression of the nitrate reductase and nitrite reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato. *Planta*, 88: 39-47.
- Bliffeld, M.- Mundy, J.- Potrykus, I.- Fütterer, J.* (1999): Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical Applied Genetics*, 98: 1079-1086.
- Bommineni, V.R.- Jauhar, P.P.- Peterson, T.S.* (1997): Transgenic durum wheat by microprojectile bombardment of isolated scutella. *Journal of Heredity*, 88: 475-481.
- Callaci, J.J.- Smarelli, J.Jr.* (1991): Regulation of the inducible nitrate reductase isoform from soybeans. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088: 127-130.
- Calza, R.- Huttner, E.- Vincentz, M.- Rouzé, P.- Galangau, F.- Vaucheret, H.- Chérel, I.- Meyer, C.- Kronenberger, J. - Caboche, M.* (1987): Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductases from higher plants. *Molecular and General Genetics*, 209: 552-562.
- Campbell, W.H.* (1996): Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiology*, 111: 355-361.
- Campbell, W.H.* (1999): Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology*, 50: 277-303.
- Campbell, B.T.- Baenziger, P.S.- Mitra, A.- Sato, S.- Clemente, T.* (2000): Inheritance of multiple transgenes in wheat. *Crop Science*, 40: 1133-1141.
- Campbell, W.H.- Kinghorn, J.R.* (1990): Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem. Science*, 15: 315-319.
- Chan, M.T.- Chang, H.H.- Ho, S.L.- Tong, W.F.- Yu, S.M.* (1993): *Agrobacterium* mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Molecular Biology*, 22:491-506.
- Chang, Y.F.- Wang, W.C.- Warfield, C.Y.- Nguyen, H.T.- Wong, J.R.* (1991): Plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 9: 611-614.

- Chen, W.P.- Chen, P.D.- Liu, D.J.- Kynast, R.- Friebe, B.- Velezhahan, R.- Muthukrishnan, S.- Gill, B.S. (1999): Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theoretical Applied Genetics*, 99: 755-760.
- Cheng, C.L.- Acedo, G.N.- Dewdney J.- Goodman H.M. - Cockling M.A. (1991): Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiology*, 96: 275-279.
- Cheng, M.- Fry, J.E.- Pang, S.- Zhou, H.- Hironaka, C.M.- Duncan, D.R.- Conner, T.W.- Wan, Y. (1997): Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumifaciens*. *Plant physiology*, 115: 971-980.
- Christensen, A.H. Sharrock, R.A.- Quail, P.H. (1992): Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript slicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689.
- Crawford, N.M. (1995): Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 7: 859-868.
- Crawford, N.M.- Smith, M.- Bellissimo, D.- Davis, R.W. (1988): Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNA encoding nitrate reductase, a metalloflavoprotein with three functional domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85: 5006-5010.
- Crawford, N.M.- Wilkinson, J.Q.- Labrie, S.T. (1992): Metabolic control of nitrate reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Australian Journal of Plant Physiology* 19: 377-385.
- Daniel-Vedele, F.- Filleur, S.- Caboche, M. (1998): Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Current opinion in plant biology*, 1: 235-239.
- Deng, M.- Moureaux, T.- Cherel, I.- Boutin, J.P.- Caboche, M. (1991): Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29: 239-247.
- Doddema, H.- Hofstra, J.J.- Feenstra, W.J. (1978): Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate and chlorate. *Physiologia Plantarum*, 43: 343 -350.

- Doddema, H.- Telkamp, G.P.* (1979): Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate, II. Kinetics. *Physiologia Plantarum*, 45: 332-328.
- Duncanson E.- Gilkes A.F.- Kirk D.W.- Sherman A.- Wray J.L.* (1993): Nir1, a conditional-lethal mutation in barley causing a defect in nitrite reduction. *Molecular and General Genetics*, 236: 275-282.
- Dwivedi, U.N.- Shiraishi, N.- Campbell, W.H.* (1994): Identification of an "essential" cysteine of nitrate reductase via mutagenesis of its recombinant cytochrome b reductase domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 13785-13791.
- Dzuibany, C.- Haupt, S.- Fock, H.- Biehler, K.- Migge, A.- Becker, T.W.* (1998): Regulation of nitrate reductase transcript levels by glutamine accumulating in the leaves of a ferredoxin-dependent glutamate synthase-deficient *gluS* mutant of *Arabidopsis thaliana*, and by glutamine provided via the roots. *Planta*, 206: 515-522.
- DeBlock, M.- Debrouwer, D.- Moens, T.* (1997): The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the *barnase* gene under the control of tapetum specific promoters. *Theoretical Applied Genetics*, 95: 125-131.
- Edwards, A.- Fulton, D.C.- Hylton, C.M.- Jobling, S.A.- Gidley, M.- Rössner, U.- Martin, C.- Smith, A.* (1999): A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant Journal*, 17: 251-261.
- Fedorova, E.- Greenwood, J.S.- Oaks, A.* (1994). In-situ localization of nitrate reductase in maize roots. *Plants*, 194: 279-288.
- Felföldi, K.- Purnhauser, L.* (1992): Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cereal Research Communications*, 20: 3-7.
- Ferrari, T.E.- Yoder, O.C.- Filner, P.* (1973): Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues. Evidence for the nitrate pools. *Plant physiology*, 51: 423-431.
- Ferrario, S.- Valadier, M.H.- Morot-Gaudry J.F.- Foyer, C.H.* (1995): Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. *Planta*, 196: 288-294.
- Foyer, C.H.- Lefebvre, C.- Provot, M.- Vincentz, M.- Vaucheret, H.* (1993): modulation of nitrogen and carbon metabolism in transformed *Nicotiana plumbaginifolia*

- mutant E22 lines expressing either increased or decreased nitrate reductase activity. *Aspects of Applied Biology*, 34: 137-145.
- Friemann, A.- Brinkmann, K.- Hachtel, W.* (1991): Sequence of a cDNA encoding bi-specific NAD(P)H-nitrate reductase from the tree *Betula pendula* and identification of conserved protein regions. *Molecular and General Genetics*, 227: 97-105.
- Funatsuki, H.- Kuroda, M.- Lazzeri, P.A.- Müller, E.- Lörz, H.- Kishinami, I.* (1995): Fertile transgenic barley generated by direct transfer to protoplasts. *Theoretical Applied Genetics*, 91: 707-712.
- Gabard, J.- Pelsy, F.- Marion-Poll, A.- Caboche, M.- Sallbach, I.- Grafe, R.- Müller, A. J.* (1988): Genetic analysis of nitrate reductase deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for six complementation groups among 70 classified molybdenum cofactor deficient mutants. *Molecular and General Genetics*, 213: 206-213.
- Galangau, F.- Daniel-Vedele, F.- Moureaux, T.- Dorbe, M-F.- Leydecker, M.T.- Caboche, M.* (1988): Expression of leaf nitrate reductase gene from tomato and tobacco in relation to light dark regimes and nitrate supply. *Plant Physiology*, 88: 383-388.
- Garde, J.- Kinghorn, J.R.- Tomsett, A.B.* (1995): Site-directed mutagenesis of nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*. Identification of some essential and nonessential amino acids among conserved residues. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 6644-6650.
- Gaudinova, A.* (1990): The effect of cytokinins on nitrate reductase activity. *Biologia Plantarum (Praha)*, 32: 89-96.
- Glass, A.D.M.- Shaff, J.E.- Kochian, L.V.* (1992): Studies of the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiology*, 99: 456-463.
- Glass, A.D.W. – Siddiqi, M.Y.* (1995): Nitrogen absorption by plant roots. In: *Nitrogen Nutrition in Higher Plants*. Ed.: *Srivastava, H.S.– Singh, R.P.* New Delhi, Associate Publishers, 21-56
- Gobel, E.- Lörz, H.* (1988): Genetic manipulation of cereals. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 5: 1-22.
- Gojon, A.- Dapoigny, L.- Lejay, L.- Tilard, P.- Rurty, T.W.* (1998): Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on 15 NO_3^- uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant, Cell and Environment*, 21: 43-53.

- Granstedt, R.C.- Huffaker, R.C.* (1982): Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. *Plant Physiology*, 70: 410-413.
- Guerrero, M.G.- Vega, J.M.- Losada, M.* (1981): The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 32: 169-204.
- Hauptmann, R.M.- Vasil, V.- Ozaias-Aikins, P.- Tabaeizadeh, Z.- Rogers, S.G.- Fraley, R.T.- Horsch, R.B.- Vasil, I.K.* (1988): Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformation in the Germinaeae. *Plant Physiology*, 86: 602-606.
- Hawker, K.L.- Montague, P.- Kinghorn, J.R.* (1992): Nitrate reductase and nitrite reductase transcript levels in various mutants of *Aspergillus nidulans* - confirmation of autogenous regulation. *Molecular and General Genetics*, 231: 485-488.
- He, G.Y.- Rooke, L.- Steele, S.- Békés, F.- Gras, P.- Tatham, A.S.- Fido, R.- Barcelo, P.- Shewry, P.R.- Lazzeri, P.A.* (1999): Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) with high-molecular-weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Molecular Breeding*, 5: 377-386.
- Hiei, Y.- Ohta, S.- Komari, T.- Kumashiro, T.* (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6: 271-282.
- Hoff, T.- Stumann, B.M.- Heningsen, K.W.* (1992): Structure, function and regulation of nitrate reductase in higher plants. *Physiology Plantarum*, 84: 616-624.
- Hoff, T.- Truong, H.N.- Caboche, M.* (1994): The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant Cell and Environment*, 17: 489-506
- Hole, D.J.- Emran, A.M.- Fares, Y.- Drew, M.C.* (1990): Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiology*, 93: 642-647.
- Howard, W.D.- Solomonson, L.P.* (1982): Quaternary structure of assimilatory NADH: nitrate reductase from *Chlorella*. *The Journal of Biological Chemistry*, 257: 10243-10250.
- Huang, N.C.- Chiang, C.S.- Crawford, N.M.- Tsay, Y.I.* (1996): *Chl1* encodes a component of the low affinity nitrate uptake system in arabidopsis and shows cell type specific expression in roots. *Plant Cell*, 8: 2183-2191.

- Huber, S.C.- Huber, J.L.- McMichael, R.W.* (1994): Contract of plant enzyme activity by reversible protein phosphorylation. *International Revue of Cytology*, 149: 47-85.
- Ingram, H.M.- Power, J.B.- Lowe, K.C.- Davey, M.R.* (1999): Optimisation of procedures for microprojectile bombardment of microspore-derived embryos in wheat. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 57: 207-210.
- Jackson, W.A.- Pan, W.A.- Moll, R.H.- Kamprath, E.J.* (1986): Uptake, translocation and reduction of nitrate. In: *Neyra, O.* (ed) *Biochemical Basis of Plant Breeding*. Boca Raton 78-106.
- Jefferson, R.A.* (1987): Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports*, 5: 387-405.
- Kaiser, W.M.- Huber, S.C.* (1994): Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiology*, 106: 817-821
- King, B.J.- Siddigi M.Y.- Glass A.D.* (1992): Studies of the uptake of nitrate in barley. V. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity-implications for nitrate influx. *Plant Physiology*, 99: 1582-1589.
- King, B.J.- Siddigi M.Y.- Ruth, T.J.- Warnwr, R.L.- Glass A.D.* (1993): Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiology*, 102: 1279-1286.
- Kleinhofs, A.- Warner, R.L.* (1990): Advances in nitrate assimilation. In: *The Biochemistry of Plants (Mifflin B.J.- Lea P.J.* (eds.), Academic Press, San Diego, CA. USA p. 89-120.
- Koltay, Á.- Balla, L.* (1982): *Búzatermesztés és-nemesítés*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest
- Kozziel, G.M.- Beland, G.L.- Bowman, C.* (1993): Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus Thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1: 194-200.
- Krapp, A.- Fraisier, V.- Scheible, W.R.- Quesada, A.- Gojon, A.- Stitt, M.- Caboche, M.- Daniel-Vedele, F.* (1998): Expression studies of Nrt2:1np, a putative high affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *Plant Journal*, 14: 723-731.
- KSH* (2000): Magyar statisztikai zsebkönyv.
- KSH* (2001): Nemzetközi statisztikai évkönyv. szerk.: Ligeti Csák, KSH. Budapest

- Labrie, S.T.- Wilkinson, J.Q.- Crawford, N.M.* (1991): Effect of chlorate treatment on nitrate reductase and nitrite reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 97: 873-879.
- Labrie, S.T.- Wilkinson, J.O.- Tsay, Y.F.- Feldmann, K.A.- Crawford, N.M.* (1992): Identification of 2 tungstate-sensitive molybdenum cofactor mutants, *chl2* and *chl7*, of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 233: 169-176.
- Lamachia, C.- Shewry, P.R.- DiFonzo, N.- Forsyth, J.L.- Harris, N.- Lazzeri, P.A.- Napier, J.A.- Halford, N.G.- Barcelo, P.* (2001): Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed. *Journal of Experimental Botany*, 52: 243-250.
- Larsson, C.M.- Ingemarsson, B.* (1989): Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In: Wray, J.L.- Kinghorn, J.R. (eds). *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*. Oxford Science Publications, Oxford p. 8-14.
- Lásztity, R.* (1996): *The Chemistry of Cereal Proteins* (2nd ed.) CRC Press, Boca Raton, USA
- Lejay, A.- Quillere, I.- Roux, Y.- Tillard, P.-Cliquet, J.B.- Meyer, C.- Morot-Gaudry, J.F.- Gojon, A.* (1997): Abolition of posttranscriptional regulation of nitrate reductase partially prevents the decrease in leaf NO₃⁻ reduction when photosynthesis is inhibited by CO₂ deprivation but not in darkness. *Plant Physiology*, 115: 623-631.
- Li, H.- Qureshi, J.A.- Kartha, K.K.* (1988): The influence of different temperature treatments on anther culture response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 57: 55-61.
- Li, X.Z.- Larson, D.E.- Glibetic, M.- Oaks, A.* (1995): Effect of glutamine on induction of nitrate reductase. *Physiologia plantarum*, 93: 740-744.
- Lillo, C.* (1991): Diurnal variations of corn leaf nitrate reductase: an experimental distinction between transcriptional and post-transcriptional control. *Plant Science*, 73: 149-154.
- Lillo, C.- Meyer, C.- Ruoff, P.* (2001): The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology*, 125: 1554-1557.
- Lillo, C.- Smith, L.H.- Nimmo, H.G.- Wilkins, M.B.* (1996): Regulation of nitrate reductase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities in barley leaf protoplasts. *Planta*, 200: 181-185.

- Long, D.M.- Oaks, A.- Rothstein, S.J (1992): Regulation of maize root nitrate reductase mRNA levels. *Physiological. Plantarum*, 85: 561-566.
- Lu, G.- Lindqvist, Y.- Schneider, G.- Dwivedi, U.N.- Campbell, W. (1995): Structural studies of corn nitrate reductase: refined structure of the cytochrome b reductase fragment at 2.5 Å, its ADP complex and an active site mutant and modeling of the cytochrom b domain. *Journal of Molecular Biology*, 248: 931-948.
- Lu, J.I.- Ertl, J.R.- Chen, C.M (1992): Transcriptional regulation of nitrate reductase messenger RNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiology*, 98: 1255-1260.
- Lütticke, S.- Genschel, U.- Block, M.- Kröger, C.- Walter, L.- Abel, G.- Lörz, H. (1999): Approaches to metabolic engineering of starch biosynthesis in wheat. In: Abstracts book, Genetic Tailoring of Novel Starch polymers, Carry-le-Rouet, France 1999. p 35-56.
- McElroy, D.- Wanggen, Z.- Cao, J.- Wu, R. (1990): Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 2: 163-171.
- McKintosh, C. (1992): Regulation of spinach leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1137: 121-126.
- Marion-Poll, A.- Chérel, I.- Gonneau, M.- Leydecker, M.T. (1991): Biochemical characterization of *cnx* nitrate reductase-deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Science*, 76: 201-209
- Massiah, A.- Rong, H.L.- Brown, S.- Laurie, S. (2001): Accelerated production and identification of fertile, homozygous transgenic wheat lines by anther culture. *Molecular Breeding*, 7: 163-173.
- Mellor, R.B.- Ronnenberg, J.- Campbell, W.H.- Deckmann, S. (1992): Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature*, 355: 717-719.
- Mendel, R.R. (1992): The plant molybdenum cofactor (MoCo) - its biochemical and molecular genetics. *Curr. Top. Plant Mol. Biol.*, 1: 11-16.
- Mendel, R.R. (1997): Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta*, 214: 291-297.
- Metz, P.L.J.- Nap, J.P. (1997): A transgene centred approach to the biosafety of transgenic plants: overview of selection and reporter genes. *Acta Botanica Neerl.* 46: 25-50.
- Miller, A.J.- Smith, S.J. (1996): Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany*, 47: 843-854.

- Mohr, H.- Neininger, A.- Seith, B. (1992): Control of nitrate reductase and nitrite reductase gene expression by light, nitrate and a plastidic factor. *Botanica Acta*, 105: 81-98.
- Murashige, T.- Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Neame, P.J. - Barber, M.J. (1989): Conserved domains in molybdenum hydroxylases. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 20894-20901.
- Nehra, N.S.- Chibbar, R.N.- Kutty, K.K. (1995): Wheat transformation: methods and prospects. *Plant Breeding Abstracts*, 65: 803-808.
- Nehra, N.S.- Chibbar, R.N.- Leung, N.- Caswell, K.- Mallard, C.- Steinhauer, L.- Baga, M.- Kartha, K.K. (1994): Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant Journal*, 5: 285-297.
- Nussaume, L.- Vincentz, M.- Meyer, C.- Boutin, J.P.- Caboche, M. (1995): Posttranscriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by an N-terminal deletion. *Plant Cell*, 7: 611-621
- Oostinder-Braaksma, F.J. - Feenstra, W.J. (1973): Isolation and characterisation of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* reductase. *Mutation Research*, 19: 175-185.
- Padidam, M.- Venkatesvarlu, K.- Johri, M.M. (1991): Ammonium represses NADPH-nitrate reductase in the moss *Funaria hygrometrica*. *Plant Science*, 75: 184-194.
- Pastori, G.M.- Wilkinson, M.D.- Steele, S.H.- Sparks, C.A.- Jones, H.D.- Parry, M.A.J. (2001): Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties. *Journal of Experimental Botany*, 52: 857-863.
- Pateman, J.A.- Cove, D.J.- Rever, B.M.- Roberts, D.B. (1964): A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature*, 201: 58-60.
- Pauk, J.- Manninen, O.- Mattila, I.- Salo, Y.- Pulli, S. (1991): Androgenesis in hexaploid spring wheat F₂ population and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breeding*, 107: 18-27.
- Pawelczyk, H. (1993): Labor Handbuch, Botanisches Institut und Botanisches Garten, Braunschweig, Germany

- Pelsy, F.- Gonneau, M.* (1991): Genetic and biochemical analysis of intragenic complementation events among nitrate reductase apoenzyme-deficient mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Genetics*, 127: 199-204.
- Peng, J.- Kononowicz, H.- Hodges, T.K.* (1992): Transgenic *indica* rice plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 855-863.
- Pilgrim, M.L.- Caspar, T.- Quail, P.H.- McClung, C.R.* (1993): Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 23: 349-364.
- Purnhauser, L.- Gyulai, G.* (1993): Effect of copper of shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 35: 131-139.
- Quesada, A.- Galvan, A.- Fernandez, E.* (1994): Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 27: 315-321.
- Qureshi, J.A.- Kartha, K.K.- Abrams, S.R.- Steinhauer, L.* (1989): Modulation of somatic embryogenesis in early and late stage of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos under the influence of (+)-abscisic acid and its analogs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18: 55-69.
- Rasco-Gaunt, S.- Riley, A.- Barcelo, P.- Lazzeri, P.A.* (1999): Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports*, 19:118-127.
- Rasco-Gaunt, S.- Riley, A.- Cannel, M.- Barcelo, P.- Lazzeri, P.A.* (2001): Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*, 52: 865-874.
- Rajagopalan, K.V.- Johnson, J.L.* (1992): The pterin molybdenum cofactors. *The Journal of Biological Chemistry*., 267: 10199-10202.
- Redinbaugh, M.G.- Campbell, W.H.* (1981): Purification and characterization of NAD(P)H:nitrate reductase from corn roots. *Plant Physiology*, 68: 115-120.
- Redinbaugh, M.G.- Campbell, W.H.* (1985): Quaternary structure and composition of squash NADH:nitrate reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 260: 3380-3385.
- Redinbaugh, M.G.- Huber, S.C.- Huber, J.L.- Hendrix, K.W.- Campbell, W.H.* (1996): Nitrate reductase expression in maize leaves (*Zea mays*) during light-dark transitions. Complex effects of protein phosphatase inhibitors on enzyme

- activity, protein synthesis and transcript levels. *Physiologia Plantarum*, 98: 67-76.
- Redway, F.A.- Vasil, V.- Vasil, I.K.* (1990): Characterisation and regeneration of *Triticum aestivum* L. (wheat) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 8: 714-717.
- Repellin, A.- Baga, M.- Jauhar, P.P.- Chibbar, R.N.* (2001): Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: new challenges. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 159-183.
- Rhodes, C.A.- Pierce, D.A.- Mettler, I.J.- Mascaranhas, D.- Detmer, J.J.* (1989): Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 240: 204-207.
- Rooke, L.- Békés, F.- Fido, R.- Barro, F.- Gras, P.- Tatham, A.S.- Barcelo, P.- Lazzeri, P.A.- Shewry, P.R.* (1999): Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength, *Journal of Cereal science*, 30: 115-120.
- Rooke, L.- Byrne, D.- Salgueiro, S.* (2000): Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. *Annals of Applied Biology*, 136: 167-172.
- Samuelson, M.E.- Ohlen E.- Lind, M.- Larsson, C.M.* (1995): Nitrate regulation of nitrate uptake and nitrate reductase expression in barley grown at different nitrate:ammonium ratios at constant relative nitrogen addition rate. *Physiologia Plantarum*, 94: 254-260.
- Sanford, J.C.- Smith, F.D.- Russell, J.A.* (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymology*, 217: 483-509
- Sanford, J.C.- Wolf, E.D.- Allen, N.K.* (1990): Method for transporting substances into living cells and tissues and apparatus therefor. US Patent #4945050.
- Schöndorf, T.- Hachtel, W.* (1995): The choice of reducing substrate is altered by replacement of an alanine by a proline in the FAD domain of a bispecific NAD(P)H-nitrate reductase from birch. *Plant Physiology*, 108: 203-210.
- Scheible, W.R.- González-Fontes, A.- Lauerer, M.- Müller-Röber, B.* (1997): Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell*. 9: 783-798.
- Schwarz, G.- Boxer, H.D.- Mendel, R.R.* (1997): Molybdenum cofactor biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 26811-26814.

- Schweizer, P.- Christoffel, A.- Dudler, R. (1999): Transient expression of members of the *germin*-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *The Plant Journal*, 20: 541-552.
- Sears, R.G.- Deckard, E.L. (1982): Tissue culture variability in wheat callus: induction and plant regeneration. *Crop Science*, 22:546-550.
- Shimamoto, K.- Terada, R.- Izawa, Fujimoto, H. (1989): Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts *Nature*, 338: 274-276.
- Shiraishi, N.- Sato, T.- Ogura, N.- Nakagawa, H. (1992): Control by glutamine of the synthesis of nitrate reductase in cultured spinach cells. *Plant Cell Physiology*, 33: 727-731.
- Siddiqi, M.Y. - Glass A.D.M. - Ruth, T.J. - Rufty, T.W. (1990): Studies of the uptake of nitrate of barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant Physiology*, 93: 1426-1432.
- Siddiqi, M.Y.- King, B.J. - Glass, A.D.M. (1992): Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrite reductase activity. *Plant Physiology*, 100: 644-650.
- Solomonson, L.P.- Barber, M.J. (1990): Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 225-253.
- Spencer, T.M.- Gordon-Kamm, W.J.- Daines, R.J.- Start, W.g.- Lemaux, P.G. (1990): Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 179: 625-631.
- Srivastava, H.S.- Shankar, N. (1996): Molecular biology and biotechnology of higher plant nitrate reductases. *Current Science*, 71: 702-709.
- Stallmeyer, B.- Nerlich, A.- Schiemann, J.- Brinkmann, H.- Mendel, R.R. (1995): Molybdenum cofactor biosynthesis: The *A. thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and to three *E. coli* proteins. *The Plant Journal*, 8: 751-762.
- Stalker, D.M.- McBride, K.E.- Malyi, L.D. (1988): Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242: 419-423.
- Steven, B.J.- Kirk, D.W.- Bright, S.W.J.- Wray, J.L. (1989): Biochemical genetics of further chlorate resistant, molybdenum cofactor defective, conditional-lethal mutants of barley. *Molecular and general genetics*, 219: 421-428.

- Stoger, E.- Williams, S.- Keen, D.- Christou, P. (1998): Molecular characterisation of transgenic wheat and the effect on transgene expression. *Transgenic Research*, 7: 463-471.
- Streit, L.- Martin, B.A.- Harper, J.E. (1987): A method for the separation and purification of the three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves. *Plant Physiology*, 84: 654-657.
- Su, W.- Huber, S.C.- Crawford, N.M. (1996): Identification *in vitro* of a posttranslational regulatory site in the hinge 1 region of Arabidopsis nitrate reductase. *Plant Cell*, 8: 519-527.
- Suzuki, A.- Oaks, A.- Jacquot J.P.- Vidal, J.- Gadat, P. (1985): An electron transport system in maize roots for reactions of glutamate synthase and nitrite reductase. *Plant Physiology*, 78: 374-378.
- Takumi, S.- Shimada, T. (1996): Production of transgenic wheat through particle bombardment of scutellar tissues: Frequency is influenced by culture duration. *Journal of Plant physiology*, 149: 418-423.
- Tischner, R.- Waldeck, B.- Goyal, S.S.- Rain, W.D. (1993): Effect of nitrate pulses on the nitrate-uptake rate, synthesis of mNRA coding for nitrate reductase, and nitrate-reductase activity in the roots of barley seedlings. *Planta*, 189: 533-537.
- Tingay, S.- McElroy, D.- Kalla, R.- Fieg, S.- Wang, M.- Thornton, S.- Brettel, R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal*, 11: 1369-1376.
- Thompson, J.A.- Abdullah, R.- Cocking, E.C. (1986): Protoplast culture of rice (*Oryza sativa* L.) using media solidified with agarose. *Plant Science*, 47: 123-133
- Tsay, Y.F.- Schroeder, J.I.- Feldmann, K.A.- Crawford, N.M. (1993): A herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, 72: 705-713.
- Uchimiya, H.- Handa, T.- Brar, D.S. (1989): Transgenic plants. *Journal of Biotechnology*, 12: 1-20.
- Ullrich, C.I.- Noveck, A.J. (1990): Extra and intracellular pH and membrane potential changes induced by K⁺, Cl⁻, H₂PO₄⁻ and NO₃⁻ uptake and function in root hairs of *Limnobium strombiferum*. *Plant Physiol*, 94: 1551-1567.
- Unkles, S.E.- Hawker, K.L.- Grieve, C.- Campbell, E.I.- Montague, P.- Kinghorn, J.R. (1991): CrnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the national Academy of Sciences. USA*, 88: 204-207.

- Vasil, I.K. (1988): Progress in regeneration and genetic manipulation of cereals. *Bio/Technology*, 6: 397-402.
- Vasil, V.- Castillo, A.M.- Fromm, M.E.- Vasil, I.K. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology*, 10: 667-674.
- Vasil, V.- Vasil, I.K. (1980): Isolation and culture of cereal protoplast. II. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theoretical Applied Genetics*, 56: 97-99.
- Vaucheret, H.-Palauqui, J.-H.- Mourrain, P.- Elmayan, T. (1997): Nitrate reductase and nitrite reductase as targets to study gene silencing phenomena in transgenic plants. *Euphytica*, 93: 195-200.
- Vaucheret, H.- Vincentz, M.- Kronenberger, J.- Caboche, M.- Rouzé, P. (1989): Molecular cloning and characterization of the two homeologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Molecular and General Genetics*, 216: 10-15.
- Vincentz, M.- Caboche, M. (1991): Constitutive expression of nitrate reductase allows normal growth and development of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. *The EMBO Journal*, 10: 1027-1035.
- Vincentz, M.- Moureaux, T.- Leydecker, M.-T.- Vaucheret, H. - Caboche, M. (1993): Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal*, 3: 315-324
- Walker-Simmons, M.- Kudrna, D.A- Warner, R.L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiology*, 90: 728-733.
- Weeks, J.T.- Anderson, O.D.- Blechl, A.E. (1993): Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology*, 102: 1077-1084.
- Witzens, B.- Brettel, R.I.S.- Murray, F.R.- McElroy, D.- Li, Z.- Dennis, E.S. (1998): Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment. *Australian Journal Plant Physiology*, 25: 39-44.
- Zhang, L. (2000): An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 19: 241-250.

- Zhang, W.- Wu, R. (1988): Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants. Theoretical and Applied Genetics, 76: 835-840.*
- Zhou, H.- Stiff, C.M.- Konzak, C.F. (1993): Stably transformed callus of wheat by electroporation-induced direct gene transfer. Plant Cell Reports, 12: 612-616.*