

Szomatikus hibridizáció és környezeti stresszhatással
indukálható gén izolációja: lépések a genetikai variabilitás
növeléséhez vezető úton

Tudományos tevékenységet összefoglaló (PhD) tézisek

Preiszner Johanna

Szeged, 1997



I. *S. tuberosum*+ *S. brevidens* szomatikus hibridek: előállítás és komplex jellemzés

1. Bevezetés és célkitűzések

A termesztett növényfajok vadon élő rokonai gazdag rezisztenciaforrásnak bizonyultak a növénynemesítés évszázadai során. Távoli fajok esetében azonban az ivarsejtek összeférhetlensége, illetve az embrió és az endospermium fejlődési zavarai gátat szabnak a hagyományos keresztezési módszerek alkalmazásnak. A mesterséges keresztezéssel létrehozott fajhibridek fontos objektumai a növénygenetikai kutatásoknak, használható forrást jelentenek a genetikai variabilitás növeléséhez és nemesítési alapanyag létrehozásához. A testi sejtek fúziója, a szomatikus hibridizáció alkalmas az egyes növényfajok közti ivari inkompatibilitás bizonyos mértékű áthidalására. Alkalmazásával olyan, genetikailag módosított egyedeket hozhatunk létre, melyek egyedülálló lehetőséget nyújtanak a növénynemesítés, valamint az elméleti genetikai és növényélettani kutatások számára. A szomatikus hibridekben vizsgálhatók a két, egymástól nagy evolúciós távolságra eső faj genetikai állományának és az általuk kódolt fehérjék kölcsönhatásai. A szomatikus hibridekben a szülői sejtmagok és a sejtszervecskék DNS állománya rekombinálódhat, ezáltal új tulajdonságok is létrejöhetnek.

A morfológiai bélyegek általában több gén által meghatározottak. A genetikai és morfológiai jellemzők összefüggésének vizsgálata sokváltozós analízissel választ adhat arra, mennyiben van hatása a hibridek genetikai összetételének a megjelenő tulajdonságokra. A fajspecifikus repetitív DNS szakaszok a szomatikus hibridek vizsgálatán kívül jó eszközként szolgálnak a növényi genetikai állomány szerveződésének és evolúciójának tanulmányozásához.

Célkitűzéseim voltak:

- olyan *S. tuberosum*+*S. brevidens* szomatikus fajhibridek létrehozása, melyek hordozzák a *S. brevidens*-re jellemző agronómiai szempontból értékes rezisztencia tulajdonságokat
- a hibriditás bizonyítása molekuláris biológiai és citológiai eszközökkel
- a szülői fajokra jellemző fenotípus megjelenésének vizsgálata a hibridekben sokváltozós analízissel
- a *S. brevidens*-re jellemző fagytűrés kimutatása a hibridekben
- *S. brevidens*-ből fajspecifikus repetitív DNS szekvencia izolálása, szekvenciájának jellemzése és lokalizációjának megállapítása *in situ* hibridizációval.

2. Anyag és módszer

2.1 Sejt-és szövettenyésztési módszerek

A sejtfüzióhoz használt protoplasztokat *in vitro* fenntartott *S. tuberosum* ($2n=4x=48$) illetve *S. brevidens* ($2n=2x=24$) fiatal leveleiből izoláltam Fehér és mtsai (1989) módszere szerint. A protoplasztok fúzióját 40%-os PEG oldat hozzáadásával segitettem elő (Dudits és mtsai, 1987). A hibrid sejteket Shepard és Totten (1977) módszere alapján regeneráltam. A potenciális hibrid mikrokolóniákat a szülői kolóniáknál erőteljesebb növekedésük alapján (hibrid vigor) választottam ki továbbtenyésztésre.

2.2 Molekuláris biológiai és citológiai módszerek

A genomi bank készítéséhez a *S. brevidens*-ből tisztított sejtmagból származó DNS-t részlegesen emésztettünk MboI restrikciós enzimmel, majd pGY97 klónozó vektorba építettük, a genomi bankot *E.coli* K-1400 törzsében tartottuk fennt. Fajspecifikus szekvencia keresésekor a klóntárból származó 1200 rekombináns konstrukciót tartalmazó baktérium klónt hibridizációs membránra vittem, és radioaktívan jelölt *S. brevidens* ill. *S. tuberosum* növényi DNS-sel hibridizáltam. A *S. brevidens*-sel erős, a *S. tuberosum*-mal viszont gyenge jelet adó klónokat

EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztettem és hasonló módon differenciális hibridizációval teszteltem. A fajspecifikus fragmentumokat pUC18 plazmidba klónoztam.

Southern analízishez a növényi DNS-t CTAB-t tartalmazó pufferrel izoláltam, Gill és mtsai (1991) módszere szerint. Restrikciós endonukleáz emésztéseket az enzimet gyártó cég (BRL, ill New England Biolabs) útmutatója alapján végeztem. Az emésztett DNS mintákat 0.8% agaróz-gélen, TEB pufferben (90mM Tris/bórsav, 10mM EDTA) szeparáltam, nylon membránon UV sugárzással immobilizáltam.

A DNS-DNS hibridizációhoz 25-50 ng fragmentumot jelöltem "random priming" módszerrel, alfa-³²P-dCTP vagy alfa-³²P-dATP radioaktív izotópok felhasználásával. A hibridizáló oldat összetétele: {1M NaCl, 0.1M Na₃-citrát, 10mM Tris-HCl puffer pH:8.0, 1 mM EDTA, 0.25% zsírszegény tejpor}. A hibridizációt 65°C-on 6-12-óra hosszat végeztem, a filtereket kétszer harminc percig 65 °C -on mostam 0.3M NaCl/30mM Na₃-citrát/0.1% SDS oldatban.

Az *in situ* hibridizációban a fajspecifikus DNS fragmentet nick-transzlációs módszerrel, biotinilált dUTP beépítésével jelöltem. A próbát a hibridizációs oldatban (50% formamid, 10% dextrán-szulfát, 0.5mg/ml tRNS) denaturáltam, majd a citológiai preparátumra helyezve 12 órát 37°C-on inkubáltam. A preparátumról a nem hibridizált próbát a Southern hibridizációhoz hasonlóan mosással távolítottam el. A hibridizációs jelet 3mg/ml fluoreszcein-izotiocianáthoz kötött avidinnel (FITC-avidin) hívtam elő. A hibridizációs jelet úgy erősítettem fel, hogy biotinilált anti-avidin antitestet kötöttem a FITC-avidinhoz, majd újra FITC-avidinnal inkubáltam. E lépést háromszor ismételtam. A kromoszómák DNS állományát propidium-jodiddal festettem. A preparátumokat fluoreszcencia mikroszkóppal vizsgáltam, 450-490 nm-es gerjesztési tartományban a fluoreszcein-diacetátra és 530-560 nm-nél propidium-jodidra.

Az izolált fajspecifikus DNS szekvenciáját Applied Biosystems szekvenáló rendszerrel határoztuk meg, elemzését a MICROGENIE, MULTALIN és DNASIS programokkal végeztük.

A hibridek morfológiai analíziséhez üvegházban nevelt hibridek huszonegy fenotípusos paraméterét határoztam meg, három ismétlésben. A főkomponens-analízishez Podani SYN-TAX III programcsomagját használtam (Podani, 1988).

Az izoenzim mintázatot glutaminsav-oxálacetát transzamináz és szuperoxid-dizmutáz enzimeknél határoztam meg Yagi és mtsai (1981) illetve Beauchamp és Fridovich (1971) módszerével.

A kromószaszám meghatározásához fiatal hajtásdugványok gyökereit 0.002M hidroxiquinolin oldatban kezeltem 3-4 óra hosszat, majd Carnoy reagensben fixáltam. A gyökércsúcsokat 10% pektinázt és 1.5% cellulázt tartalmazó oldatban puhítottuk 37°C-on 30-60 percig. A preparátumot karbol-fuksinnal festettem.

A szomatikus hibridek fagyűrésének vizsgálatát ötven-ötven egyeden, egy hetes 5°C-on történő akklimatizálás után -2,-3 és -4 °C-os fagyasztással végeztük, majd üvegházi körülmények között három hétig történő regenerációs periódus után az oldalrügyekből kihajtó új hajtások minőségét és zöld tömegét értékeltük ki.

3. Eredmények és értékelésük.

3.1. Szomatikus hibridek előállítása és szelekciója

A szülői fajok levélprotoplasztjai vizuálisan hasonlóak, ezért a heteroplazmás sejtek aránya (s ezen keresztül fúziós gyakoriság) nem volt megállapítható. A növekvő kolóniák szelekcióját korábbi megfigyelésekre támaszkodva arra alapoztuk, hogy a hibrid kolóniák erőteljesebb fejlődésűek lehetnek, mint a szülői egyedek. A *S. brevidens* sejtek nem képesek az adott *in vitro* regenerációs körülmények között kolóniákat képezni. A kontroll *S. tuberosum* és a fúziós kezelésből származó mikrokallusz populációból a legintenzívebben növekvő kolóniákat választottam ki a további tenyésztésre és regenerációra. A fúziós populációból származó szelektált kolóniák méretben és regenerációs képességben felülmúlták a burgonya protoklonokat. Ez a különbség a tenyésztés további fázisaiban is fennmaradt, bár nem minden hibridre volt jellemző, mint az a részletes morfológiai felméréskor tapasztalható volt. A hibrid vigorra alapuló szelekcióval azonos fajkombinációnál közel száz százalékos hibrid gyakoriság volt elérhető, melyet a hibrid kolóniák fajspecifikus DNS felhasználásával elvégzett jellemzése is igazolt (Polgár és mtsai, 1993)

3.2 Hibriditás bizonyítása

A restrikciós fragment hossz-polimorfizmus (RFLP) analízishez olyan próbát használtam, mely a burgonya 11-es kapcsoltsági csoportjához tartozik, és a *S. brevidens*-ben is e helyen lokalizált. A vizsgált hét, különböző kromoszómaszámú hibridben a szülők RFLP mintázatának addíciója volt megfigyelhető. A *S. brevidens*-re és a *S. tuberosum*-ra jellemző fragmentumok mennyiségi aránya (melyre a hibridizációs jel erősségéből következtethetünk) a legtöbb hibridben megközelítőleg 1:2, mely megfelel a közel hexaploid hibridek genetikai összetételének. A glutaminsav-oxálacetát transzamináz és szuperoxid-dizmutáz enzimek által adott mintázatot huszonhárom klónnal vizsgáltam. A feltételezett hibridek mindegyikénél megfigyelhető volt a szülőkre jellemző enzimformák egyidejű jelenléte. A mintázat minden vizsgált hibridnél azonos volt. Az RFPL analízis eredményéhez hasonlóan a hibridekben a vizsgált enzimek mindegyik lokusza legalább egy példányban megtalálható.

Harmincegy, fúziós sejtpopulációból származó regeneráns kromoszómaszámát határozta meg. A két szülői faj eltérő ploidiaszintje (*S. tuberosum* : $2n=4x=48$ illetve *S. brevidens*: $2n=2x=24$) lehetővé tette a hibridek azonosítását additív kromoszómaszámuk alapján. A *S. brevidens* és a protoplaszt eredetű *S. tuberosum* növényeknél csak igen kis eltérés volt tapasztalható a várt értéktől. A vizsgált szomatikus hibrideknél azonban nagy kromoszómaszámbeli variabilitást találtunk. A vizsgált klónok 19%-a rendelkezett a hexaploid szinthez közeli kromoszóma garnitúrával (1-2 kromoszóma veszett el). A hibridek mintegy felénél (52%) fordult elő kissé nagyobb mértékű kromoszómavesztés (3-6 kromoszóma), míg a 16%-uknál a genetikai állomány 8-12 kromoszómával csökkent. Az ennél nagyobb mértékű kromoszómavesztés, csakúgy mint a hexaploid szintet meghaladó értéke csak abnormális morfológiájú hibrideknél figyelhető meg. A nagyszámú aneuploid hibrid jelenléte magyarázható a hibridek megnövekedett ploidiaszintjével, mely a genetikai állomány instabilitását okozhatja. A magas ploidia szint a hibrid sejten kromoszómavesztést indukálhat, mellyel egy viszonylag stabilabb állapot jöhet létre, ugyanakkor az egyes kromoszómák elvesztése nem jár szükségszerűen együtt az életképesség csökkenésével. Az alkalmazott szelekciós eljárás elősegítette a populáció hexaploid klónokban való feldúsulását, az oktoploidok gyengébb

növekedésük miatt nem kerültek továbbtenyésztésre. Kismértékű kromoszóma-eliminációt a hibridek -valószínűleg magas ploidiaszintjüknek köszönhetően- morfológiai aberráció megjelenése nélkül toleráltak. A hibrid növények a vegetatív szaporítás és fenntartás mintegy másfél éve alatt megőrizték a megfigyelt citológiai jellemzőket.

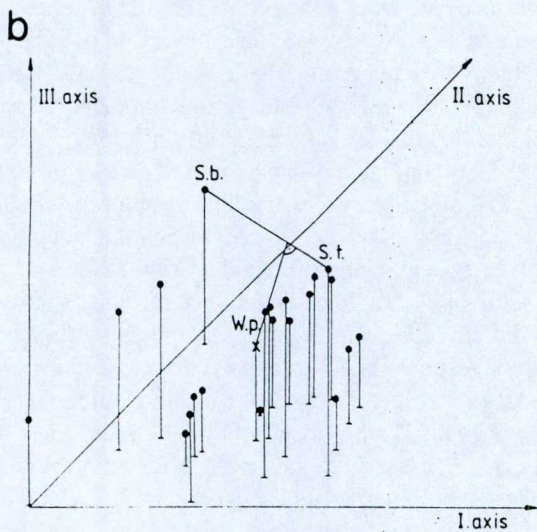
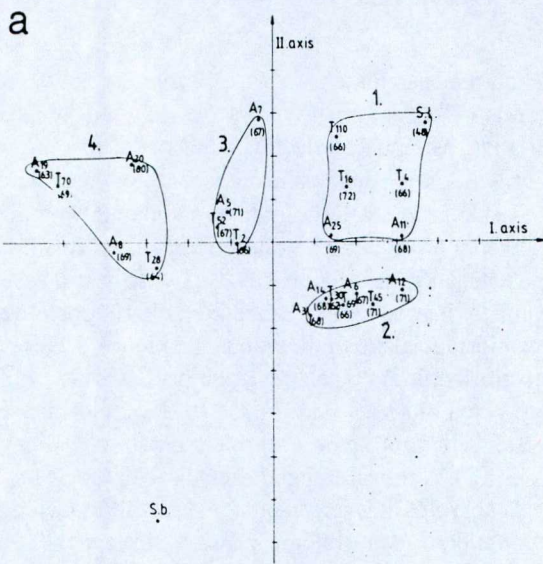
3.3 A hibridek morfológiai analízise

A szomatikus hibridek két, a *Solanum* nemzetségbe tartozó, de ezen belül távol álló faj hibridjei. A két szülői faj egymástól számos tulajdonságban különbözik, ezek közül a leglényegesebb, hogy a *S. brevidens* gumót nem képez. A hibridek általános megjelenése a burgonyára hasonlított, a különböző szervek (szár, gumó, pártá) fokozott antociános pigmentáltsága jelezte a *S. brevidens*-ből származó genetikai hatások jelenlétét. A levelek mérete és a szár átmérője a két faj közötti átmeneti értéket mutatta. Ugyanez jellemző az általunk "növény-alak"-ként definiált tulajdonságra, melyet a növény magasságának és a levelek hosszának arányával fejezhetünk ki. A hibrid növények hajtásai a legtöbb esetben magasabbak és fejlettebbek voltak, mint a burgonyáé. Legnagyobb variációt a hibridek gumóképzési tulajdonságaiban figyelhettünk meg. A vizsgált huszonegy klón közül öt nem termelt gumót. A gumók számát és összsúlyát tekintve a hibridek mindegyike messze elmaradt a *S. tuberosum* protoklónok mögött.

A morfológiai változatosság a szomatikus hibrid populációban általános jelenség, a szomaklonális variáció illetve a hibridek eltérő genetikai összetételének eredményeként. A morfológiai bélyegek általában több gén által meghatározottak. A genetikai és morfológiai jellemzők összefüggésének vizsgálata sokváltozós analízissel választhat arra, mennyiben van hatása a hibridek genetikai összetételének a megjelenő tulajdonságokra. Huszonkét morfológiai jellemzőt vontam be a főkomponens-analízisbe (PCA). Ez a sokváltozós módszer lehetővé teszi a vizsgálati objektumok (estünkben a hibridek és a szülők) elhelyezését egy multidimenzionális faktortérben, miután lineárisan nem korreláló faktorokat (főkomponenseket) képez az alapadatokból. Ezeket a főkomponenseket a mért adatokból alkotott korrelációs mátrixokból számítottam ki (centrált és standardizált PCA) és ezek szolgáltattak a multidimenzionális tér tengelyeiként. Az első három fő komponens sorrendben az összvariancia 37.0, 19.6, és 13.1 százalékát írja le. Az első fő komponens a gumóhéj színe, a gumó hossza és az indahossz adta.

A második főkomponenst főként a levelek szélessége, hosszúsága és a véglevélke alakja alkotta. A noduszok és a másodlagos levélkék számának volt a legnagyobb korrelációja a harmadik fő komponenssel. A szülői és hibrid klónok egymáshoz viszonyított helyzetét az 1-3 főkomponens által képzett scattergramon ábrázoltam (1. ábra).

A PCA térben a hibridek és a szülői klónok csoportosításában az első két komponens játszotta a főszerepet. A *S. tuberosum* és a *S. brevidens* egymástól igen távol helyezkedik el, eltérő morfológiájuknak megfelelően. A hibridek alakbeli diverzitását a klónok széles tartományban való szóródása is jelzi. Négy hibrid csoport elkülönülése figyelhető meg, s ez a hibridek valós morfológiájára visszavezethető. Bár az analízisbe csak behatárolt számú hibridet vontam be, valós morfológiájuk és a PCA térben elfoglalt helyük jó egyezést mutatott. A klónok relatív és abszolút helyzete azonban nem volt összefüggésben a kromoszómaszámukkal. A morfológiai jellegek sok-génes meghatározottságát, a szülői génkészletek esetleges kölcsönhatásait figyelembe véve az egyed fenotípusa nem köthető szorosan a kromoszómavesztés mértékéhez. Amikor a hexaploid populációt, mint egészet vizsgáltam, összefüggés mutatható ki a genetikai összetétel (a szülői genomok aránya) és a PCA térben elfoglalt pozíció között. A térben a szülői klónok közti szakaszra vetítve a hibrid populáció súlypontját, a vetületi pontnak a *S. tuberosum*-*S. brevidens* szakaszt olyan arányban kell metszenie mely megfelel a szülői génkészletek arányának a hibridekben (1/b ábra). E metszéspontnak két egységnyire a *S. brevidens*-től és egy egységnyire a *S. tuberosum*-tól kell elhelyezkednie, mivel a hexaploid szinten levő hibridek a tetraploid burgonya és a diploid *S. brevidens* genetikai készletét tartalmazzák. Esetünkben a metszéspont 1:1.87 arányban osztja a *S. tuberosum*-*S. brevidens* távolságot. Ez igen jó közelítése az elméletileg várt értéknek, annak ellenére, hogy mind a hibridek, mind a PCA tengelyek száma korlátozott. A genetikai összetétel hatása a hibridek morfológiájára, mely számos gén kölcsönhatásának eredményeként jött létre, az alkalmazott statisztikai módszerrel kimutatható volt.



1. ábra A morfológiai felmérés alapján végzett főkomponens analízis nyomán a hibrdek és a szülői klónok eloszlása a faktortérben. (a) Az első két főkomponens által meghatározott eloszlás. Zárójelben a hibrdek kromoszómaszáma látható. (b) A hibrdek eloszlása a három dimenziós térben. W.p.: a pontok által meghatározott felhő súlypontja.

3.4. A *S. brevidens* fagyűrésének megnyilvánulása a hibridekben.

A fagyűrési vizsgálatok céljára két hibrid vonalat választottam ki. A termesztett burgonya hajtásai már -2°C-on teljesen elfagytak, s a további, üvegházi körülmények között sem regeneráltak. A *S. brevidens* növények -3°C-on szintén elfagytak, azonban a három héttel későbbi vizsgálat idejére a túlélő alsó oldalrügyekből új hajtásokat képeztek. A hibridek viselkedése a *S. brevidens*-éhez hasonló volt, bár az új hajtások száma és minősége nem érte el a vad fajra jellemző értéket.

Fagyasztási hőmérséklet

	<i>S. tuberosum</i>	T28	A12	<i>S. brevidens</i>
		hibridek		
-2°C				
Elhalt (%)	100	4.0	15.0	0
Minőség*	0	2.1	1.9	4.6
Zöld tömeg (gr)	0	3.29	1.94	7.67
-3°C				
Elhalt (%)	100	44	54	38
Minőség*	0	1.1	1.4	3.4
Zöld tömeg (gr)	0	0.48	0.40	4.28
-4°C				
Elhalt (%)	100	100	100	100
Minőség*	0	0	0	0
Zöld tömeg (gr)	0	0	0	0

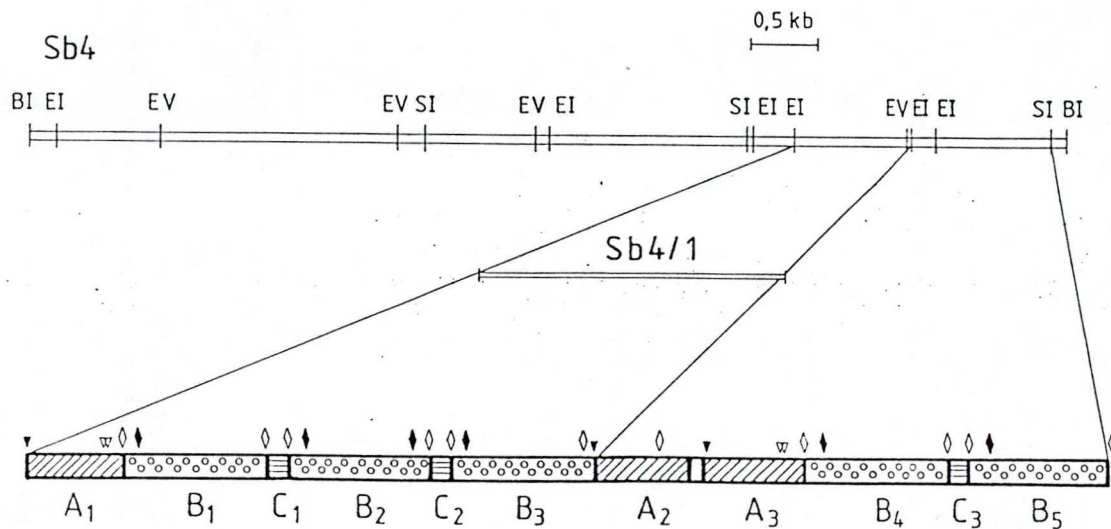
*minőség: A növények fiziológiai állapota egy önkényes skála alapján 5 (normális) - 0 (elpusztult)

3.5 *S. brevidens*- specifikus DNS szekvencia jellemzése és lokalizációja

A fajspecifikus repetitív DNS szakaszok a szomatikus hibridek vizsgálatán kívül jó eszközül szolgálnak a növény genetikai állomány szerveződésének és evolúciójának tanulmányozásához. Az *S. brevidens*-ből izolált szekvencia még alacsony hőmérsékleten sem hibridizált a *S.*

tuberosum DNS-hez, ebben a viszonylatban tehát fajspecifikusnak tekinthető. Különböző restrikciós endonuklázzal emésztett *S. brevidens* DNS-hez hibridizálva az izolált szekvenciát, jellegzetes "létrás" mintázatot kaptunk, mely a nagy kópiaszámban jelenlevő és ismétlődő DNS szekvenciákra jellemző. Az ismétlődő szekvencia elhelyezkedése a genomban nem egyenletes. *In situ* hibridizációval kimutatható volt, hogy legalább 20 *S. brevidens* kromoszóma végén megtalálható az izolált szakasz, s két (valószínűleg homológ) kromoszómán rendkívül nagy kópiaszámban fordul elő.

A meghatározott szekvencia három ismétlődő (A, B és C) és egy nem ismétlődő alegység építi fel, melyek egymáshoz nem hasonlíthatnak (2. ábra). Az alegységek egymást $A_1B_1C_1B_2C_2B_3A_2XA_3B_4C_4B_5$ sorrendben követik. Az azonos típusú alegységek közötti homológia változó és nem követi az alegységek ismétlődési sorrendjét. Az A_1-A_3 , B_1-B_4 és B_3-B_5 alegységpárok között található a legnagyobb fokú hasonlóság, tehát a homológia nem a térben legközelebb eső alegységek között a maximális. Feltételezhető, hogy a különböző alegységek egymástól független megsokszorozódása után, nagyobb egységek függetlenül is amplifikálódtak. Ugyanakkor megtalálhatók a genomban az A és B alegységek tandem ismétlődésben is, amint azt Southern hibridizációval bizonyítottuk. A vizsgált szekvencia egy szakaszán (AXA) homológia mutatható ki paradicsomból és két vad *Solanum* fajból izolált, 162 bázis hosszú repetitív szekvenciával (Stadler és mtsai, 1995). A homológia minden esetben kisebb, mint 80%. A csökkent homológia a molekuláris evolúció során bekövetkezett mutációknak köszönhető. Míg az említett fajokban a homológ szakasz tandem elrendeződésben ismétlődik, a *S. brevidens*-ben más, nem-rokon szekvenciákkal együtt összetett ismétlődő elemet alkot. Stadler és mtsai (1995) kimutatták, hogy ez az általuk leírt, s az AXA szakasszal 80%-ban homológ szakasz nem található meg a *Solanaceae* rend *Datura* és *Nicotiana* tagjainál. Ugyanakkor azonban csaknem minden *Solanum* fajban előfordul, bár a szekvencia kópiaszáma a *S. tuberosum*-ban igen alacsony. Valószínű, hogy az AXA szakasz a *Solanum* és *Lycopersicon* fajok közös őseiben már jelen volt, és amplifikációval illetve mutációkkal és rekombinációkkal alakultak ki a ma megfigyelhető szekvencia- és szerveződésbeli különbségek.



Sb4/2

2. ábra.

A *Solanum brevidens*-re specifikus ismétlődő szekvenciákat tartalmazó DNS vázlatos felépítése. Sb4: a klónozott szakasz. Sb 4/1 és Sb 4/2: a klónozott DNS-en a fajspecifikus repeatok elhelyezkedése. Restriktions endonukleázok hasítóhelyei: EV: Eco RV, EI: Eco RI, SI: Sal I, BI: Bam HI, (w): Eco RI, (v): Dra I, (o): Hae III, (p): Taq I.

II. Szója (*Glycine max*) alkohol dehidrogenáz gén és promoterének izolálása és jellemzése

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1 Az alkohol-dehidrogenáz szerepe a növények árasztástûrésében

Az ADH enzim aktivitása a legtöbb növényfajban anaerob körülmények között fokozódik. Az enzimaktivitás növekedése elsősorban a megnövekedett mRNS szintnek köszönhető. Az enzim általános funkciója az acetaldehid etanollá redukálása, ezáltal NAD^+ képződik, amely anaerob körülmények között a glikolízisben felhasználódik. Oxigén hiányában ez a folyamat biztosítja a NAD^+ -ot a glikolízis számára, ennek hiányában nem termelődik elegendő ATP, melyet a szintetizáló folyamatok használnak fel. Az *Adh* gén expressziója nem csak a növényi szövetek bizonyos anaerob fejlődési stádiumaiban (pl pollen érés) fokozódik, hanem bármilyen, oxigénhiányos állapotot kiváltó környezeti hatásra is. A USA középnyugati területein a szójatermésben jelentős kárt okoznak a kora-tavasztól kora-nyárig tartó esőzés következtében kialakuló belvizek. Az ADH enzimnek kulcs-szerepe van a növények árasztástûrő-képességében. A víz alá merített növényi részekben az alapállapotban csak kismértékben kifejeződő *Adh* gén expressziója akár 10-15-szörösére is növekedhet, így biztosítva a megfelelő NAD^+ szintet a glikolízis számára (Roberts et al 1989). A génexpresszió ilyen nagyfokú növekedését az *Adh* gén promotere teszi lehetővé. Bár a gén terméke szójában ismert (Newman & VanToai, 1991), a gén pontos struktúrája és promoterének szekvenciája fontos információt nyújthat a további kutatások számára. A promotert -eredeti formájában vagy hatékonyságát növelve- szándékunk szerint felhasználhatjuk, mint egy anoxia által indukálható promotert, mely a mögé épített gén expresszióját az oxigén jelenlététől függő módon szabályozza.

Célkitűzésem volt a szója *Adh* gének szerkezetének és promoter-szekvenciájának, valamint a szója *Adh* géncsalád nagyságának meghatározása.

Anyag és módszer

A szója genomi könyvtárat Dr Goldberg (UCLA) bocsátotta rendelkezésünkre. A Charon4A vektorba klónozott szubsztitúciós könyvtár készítésekor EcoRI restrikciós enzimmel emésztett *Glycine max* cv. Dare genomikus DNS-t használtak fel. A génkönyvtárt egy szója *Adh* #10 cDNS-sel teszteltük (Newman & VanToai, 1991), 37°C-os hibridizációs hőmérsékleten. A pozitív fágklónokból nyert DNS restrikciós térképét meghatároztuk és a kódoló szekvenciát pBluescript SK (+/-) vektorba klónoztuk. A kukorica *Adh* gén első exonjával hibridizáló, és négy kilobázisnál nagyobb fragmenteket (ezek feltételezhetően tartalmazzák a promotert) is pBluescript SK (+/-) vektorba klónoztam.

A DNS-DNS hibridizációhoz 25-50 ng fragmentumot jelöltem "random priming" módszerrel, alfa-³²P-dCTP vagy alfa-³²P-dATP radioaktív izotópok felhasználásával. A hibridizáló oldat összetétele: {1M NaCl, 0.1M Trinátrium-citrát, 10mM Tris-HCl puffer pH:8.0, 1 mM EDTA, 0.25% zsírszegény tejpor}. A hibridizációt 65°C-on 6-12-óra hosszát végeztem, a filtereket kétszer harminc percig 65°C-on mostam 0.3M NaCl/30mM Na₃-citrát/0.1% SDS oldatban. Az izolált fajspecifikus DNS szekvenciáját Applied Biosystems szekvenáló rendszerrel határoztuk meg, elemzését a MULTALIN és DNASIS programokkal végeztük

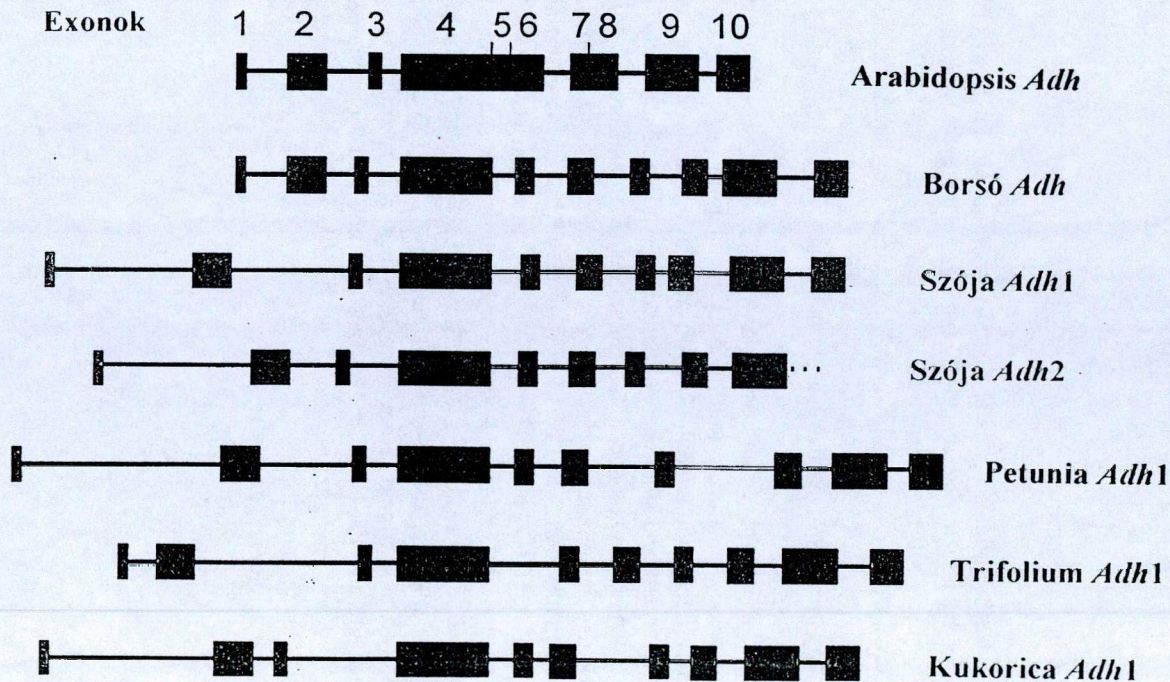
3. Eredmények és azok értékelése

3.1 Szója alkohol-dehidrogenáz gének száma és struktúrája

A szója *Adh* gén negyedik exonját használtam Southern hibridizációban próbaként, hogy megállapítsuk géncsalád nagyságát. A hét különböző restrikciós endonukleázzal hasított szója genomikus DNS négy-öt különböző méretű fragmentjéhez hibridizált a próba. Eredményeim megerősítik Gorman és Kiang (1978) következtetéseit, mely szerint -az ADH izoenzim mintázatát és annak öröklődését tanulmányozva- öt tagú géncsalád-modellt javasoltak elfogadásra.

A génkönyvtárban négy egyedi *Adh* gént találtam, két klónt jellemeztem részletesen. A szója *Adh* gének a többi növényi *Adh* génhez hasonlóan tíz exonból és kilenc intronból állnak (3. ábra).

Az exonok mérete igen erősen konzervatív, szekvenciájuk kis mértékben különböző. Az exonok szekvenciájából következtethető mRNS megfeleltethető az eddig ismert háromféle szója *Adh* cDNS szekvencia valamelyikének. A kódoló régióban és az intron/exon határokon semmiféle olyan mutáció nem található, mely megkérdőjelezné az izolált gén aktív voltát. Az intronok mérete még az egy fajon belüli gén különböző tagjainál is változó. A szója *Adh1* és a szója *Adh2* génben a második intron méretében mintegy háromszoros a különbség. Az intronok mérete és szekvenciája nem csak a gén méretére van hatással, hanem befolyásolhatja az *in vivo* génexpresszió mértékét is, amint azt más fajokban már kimutatták (Yu és Edenberg, 1995). A szója *Adh* gének első intronjának szekvenciája igen eltérő, bár mindkettőben találhatók GGTTTTT szekvencia-motívumok (GT-motívum). Ezek a motívumok az anoxia által indukálható növényi gének (pl *Adh*, glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz) promotereiben felelősek az anoxia-specifikus indukcióért (Manjunath & Sachs, 1997; Dolféus et al, 1994). További vizsgálatokat tervezünk annak eldöntésére, hogy a szója *Adh* gén első intronjának jelenéte vagy hiánya mennyiben befolyásolja a gén kifejeződését.



3. ábra. A szója *Adh-1* és a szója *Adh-2* gén struktúrája nem különbözik egyéb növényi *Adh* génekétől

3.3 Szója *Adh* gén promotere

Az *Adh* gén kódoló régiójától 5' irányban található DNS szakasz mintegy ezer bázispárnyi szekvenciáját határoztam meg. A transzláció kezdő kodonjától -110 bázispárra található a feltételezett TATA-box (TATAAAAAA). A TATA-box pozíciója a transzkripció kezdőpontjától hatvankét bázisnyira esik, a cDNS szekvenciája ugyanis tartalmaz egy mintegy ötven bázispárnyi nem-transzlálódó ún. "leader"-szekvenciát.

Több olyan szekvencia-motívum van, mely felelős az *Adh* génnek expressziójának anaerob körülmények hatására bekövetkező indukciójáért. Ezek a motívumok (ARE-k: Anoxia Responsive Elements) a gének promotereiben különböző elrendezésben találhatók, jelenlétük elengedhetetlen az anoxia-specifikus indukció folyamatában. Az *Adh* promotereken megtalálható következő motívumok bizonyítottan felelősek az indukcióért: GGTTTTT (GT-motívum, Dolferus és mtsai, 1994), G-box (GTGG, Paul & Ferl, 1991), GC-motívum (CG/CGGC, Olive és mtsai, 1991). A szója *Adh* gén promoterén ezek a motívumok szintén előfordulnak (4. ábra). Az *Adh* géncsalád e tagjánál a növény szöveteiben az alapexpresszió rendkívül alacsony, s míg levélben nem indukálható a transzkripció, a növény gyökerében, a hipokotilban és a sziklevéiben anoxia hatására mintegy ötszörösére növekszik (Newman & VanToai, 1991). Feltételezhető, hogy az ARE-k relatív és abszolút helyzete felelős a specifikus szöveti reakcióért, további kísérleteket folytatunk e feltételezés igazolására.

A szója Adh gén promotere (jelen tanulmány)

-255 -175
5' AGTTTACGTGGCATGTGTATTGTGTGTACCAACGAACCTATGGCGCGCTTGGAACTAAACCAAGTGGTTTTGTTCAT 3'
3' TCAAAATGCACCGTACACATAACACACATGGTTTGCTTGGATACCGCGCGGAACCTTGATTGGTTTCAACAAAACAGTA 5'

Kukorica Adh-1 gén promoter (Paul & Ferl, 1991)

-177 -104
5' GAACCACGGTCCACGGCTATGTTCCAGGTGGAGCTGCAGCCCCGTTTCGCAAGCGCGCGCGTGGTTTGCTTGCC 3'
3' CTTGGTGCCAGGTGCCGATACAAGGTCCACCTCGACGTCGGGCCAAGCGTTGGCGCGGCACCAACGAACGG 5'

Petunia Adh-2 gén promoter (Gregerson et al, 1993)

-110 -30
5' TTTGTAAACCAAAACCAGAGACTAAACCTGCAAACGGTTTACCATGGCCTATTGTTCTTTGTTTTAAACCAATTTTCAAG 3'
3' AAACATTTGGTTGGTCTCTGATTTTGGACGTTTCCAAAATGGTACCGGATAACAAGAAACAAAATTGGTTTAAAGTC 5'

Borsó Adh gén promoter (Llewellyn et al, 1987)

-243 -168
5' AGAAGATTTCGAAAACCATCAGCTACAGTTGGTGTCTGGTCCGGTTAAGTCAAAACCCAAAAGCGCGCCGCGCCTGG 3'
3' TCTTCTAAGCTTTTGGTAGTCGATGTCAACCACAGACCAGGCCAATTTCAGTTTGGGTTTTCCGCGGGCGGCGGACC 5'

Arabidopsis Adh gén promoter (Dolferus et al, 1994)

-220 -140
5' AGAATGCCACGTGGACGAATACTAGCAACCCAAGTGAAGAGCGTTCGAGAGAACAAAGGCAAAACAAATACGCCCCCTAGT 3'
3' TCTTACGGTGCACTGCTTATGATCGTTGGGTTACCTTCTCGAAGCTCTCTTGTTCCTTTGGTTTATCGCGGGGATCA 5'

GT motívum: GGGTTT
CCAAAA
(Dolferus et al, 1994)

G-box: GTGG
CACC
(Paul & Ferl, 1991)

GC motívum: CG/CGGGC
GC/GCCCG
(Dolferus et al, 1994)

4. ábra A szója Adh gén promoterén megtalálhatók az anaerob indukcióhoz szükséges rövid szekvenciamotívumok

Összefoglaló

1. *S. tuberosum* és *S. brevidens* fajok levélprotoplasztjainak fúzióját követően hibrid mikrokolóniákat szelektáltunk, melyek növekedési erélye meghaladta a szülői vonalakét, s e tulajdonságuk alapján a szövettenyésztés korai fázisában a hibrideket azonosítani tudtuk.

2. A regenerált klónok hibrid voltát RFLP- és izoenzim mintázat vizsgálatával, valamint citológiai analízissel bizonyítottam.

3. Bár a hibridekben kromoszómavesztés előfordult, az aneuploidia mértéke nem volt hátrányos hatással a hibridek életképességére.

4. A regenerált hibrid növényekben mindkét szülő tulajdonságai egyidejűleg kifejeződtek. Többváltozós analízissel kimutattam, hogy a hexaploid vonalak fenotípusai a két szülő közti átmenetet képviselnek, mégpedig a szülői genomok arányának megfelelően.

5. A hibridekben megnyilvánul a *S. brevidens*-re jellemző fagy-tolerancia, melynek eredményeként fagyhatás után az alsó oldalrügyekből új hajtásokat képesek a hibrid növények létrehozni.

6. A *S. brevidens*-ből leírt repetitív szekvencia organizációja nem azonos a vele bizonyos fokú homológiát mutató, más *Solanaceae* családból ismert tandem ismétlődésben előforduló szakasszal. Valószínű, hogy egy egyszerű, ősi szekvencia evolúciójának eredményeként alakultak ki a jelenlegi szerveződési különbségek a vizsgált fajokban.

7. Izoláltam a szója alkohol-dehidrogenáz enzim géncsaládjának két tagját, valamint az *Adh* gén promoterét. A gének felépítése hasonló más növényi *Adh* génekhez, jelentős különbség az intronok méretében van.

8. A szója *Adh* gén promoterén megtalálhatók olyan szekvenciamotívumok, melyek felelősek más, növényekben található anoxia által indukálható gének differenciális expressziójáért.

Felhasznált irodalom:

- Beuchamp C, Fridovich I (1971) Superoxid dismutase: improved assays and an assay applicable to polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287.
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, Dennis ES (1994) Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol* 105:1075-1087
- Dudits D, Maróy E, Praznovszky T, Oláh Z, Györgyey J, Cella R (1987) Transfer of resistance trait from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: regeneration of fertile plants. *PNAS* 84:8434-8438.
- Fehér A, Preiszner J, Dudits D (1989) Differentiation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants from cultured leaf protoplasts. *Acta Biol Hung* 40:369-380.
- Gill KS, Lubbers EL, Gill BS, Raup WJ, Cox TS (1991) A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat. *Genome* 34:362-374.
- Gorman MB, Kiang YT (1978): Models for the inheritance of several variant soybean electrophoretic zymograms. *J Hered* 69: 225-258.
- Gregerson RG, Cameron L, McLean M, Dennis P, Strommer J (1993) Structure, expression, chromosomal location and product of the gene encoding *Adh2* in *Petunia*. *Genetics* 133: 999-1007.
- Llewellyn DJ, Finnegan EJ, Ellis JG, Dennis EJ, Peacock WJ (1987) Structure and expression of alcohol dehydrogenase-1 gene from *Pisum sativum*. *J Mol Biol* 195:115-123
- Newman K, VanToai TT (1992) Molecular characterization of the soybean alcohol dehydrogenase gene family amplified in vitro by the polymerase chain reaction. *Plant Physiol* 100:489-495.
- Olive MR, Peacock JW, Dennis E (1991) The anaerobic responsive element contains two GC-rich sequences essential for binding a nuclear protein and hypoxic activation of the maize *Adh1* promoter. *NAR* 19:753-7060.
- Paul AL, Ferl RJ (1991) In vivo footprinting reveals unique cis-elements and different modes of hypoxic induction in maize *Adh1* and *Adh2*. *The Plant Cell* 3: 159-168.

- Podani J (1988) SYN-TAX III. Computer programs for data analysis in ecology and systematics: a users manual. Abstr Bot 12 Suppl.1.
- Polgár Zs, Preiszner J, Dudits D, Fehér A (1993): Vigorous growth of fusion products allows highly efficient selection of interspecific somatic hybrids: molecular proof. Plant Cell Reports 12:399-402.
- Roberts JKM, Chang K, Webster C, Callis J, Walbot V (1989) Dependence of ethanolic fermentation, cytosolic pH regulation and viability on the activity of alcohol-dehydrogenase in hypoxic maize roots. Plant Physiol 89:1275-1278.
- Manjunath S, Sachs MM (1997) Molecular characterisation and promoter analysis of maize cytosolic glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. Plant Mol Biol 33:97-112.
- Shepard JF, Totten RE (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato - isolation, proliferation and plant regeneration. Plant Physiol 60:313-316.
- Stadler M, Stelzer T, Borisjuk N, Zanke C, Schilde-Rentsler L, Hemleben V (1995) Distribution of novel and known repeated elements of *Solanum* and application for the identification of somatic hybrids among *Solanum* species. Theor Appl Gen 91:1271-1278.
- Yagi T, Kagamiyama H, Nozaki M (1981) A sensitive method for the detection of aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase activity on polyacrilamide gels. Anal Biochem 110:146-149
- Yu M, Edenberg HJ (1995) Structure and function of a long alternating purine-pyrimidine sequence in the mouse alcohol dehydrogenase *Adh-1*. Arch Biochem Biophys 316:407-4012.

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk:

"I. *S. tuberosum*+ *S. brevidens* szomatikus hibridek: előállítás és komplex jellemzés"-e tézisponthoz:

- A.Fehér, J.Preiszner, D. Dudits (1989): Differentiation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants from cultured leaf protoplasts. *Acta Biol. Hung.* 40:369-380.
- J.Preiszner, A.Fehér, O.Veisz, J.Sutka, D.Dudits (1991): Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum*) and *S. brevidens*. *Euphytica* 57:37-49.
- Zs.Polgár, J.Preiszner, D.Dudits, A.Fehér (1993): Vigorous growth of fusion products allows highly efficient selection of interspecific somatic hybrids: molecular proof. *Plant Cell Reports* 12:399-402.
- J.Preiszner, I.Takács, M.Bilgin, J.Györgyey, D. Dudits, A.Fehér (1994): Organization of a *Solanum brevidens* repetitive sequence related to the TGR1 subtelomeric repeats of *Lycopersicum esculentum*. *Theoretical and Applied Genetics* 89:1-8.

"II. Szója (*Glycine max*) alkohol dehidrogenáz gén és promoterének izolálása és jellemzése"-tézisponthoz

- J.Preiszner, K.Newman, H.H. Yen, T.T.VanToai (1997) Structure and expression of the soybean alcohol-dehydrogenase genes (Abstract). In: Abstracts of the 5th International Plant and Animal Genome Meeting, San Diego, 1997. P 66.

Egyéb, a témához kapcsolódó publikációk:

- A.Fehér, J.Preiszner, D. Dudits (1990): Gene transfer into potato (*Solanum tuberosum* L.): Asymmetric somatic hybridization. *Napjaink Biotechnológiája* 25: 33-45.
- A.Fehér, K.Felföldi, J.Preiszner, D. Dudits (1991): Efficient PEG-mediated transformation of leaf protoplasts of *Solanum tuberosum* L. cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 105-114.
- A.Fehér, J.Preiszner, Z. Litkey, Gy Csanádi, D.Dudits (1992): Characterisation of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by X-ray fusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *S. brevidens* Phil. *Theoretical and Applied Genetics* 84:880-890
- A.Fehér, K.G.Skrjabin, E.Balázs, J.Preiszner, O.Shulga, V.M.Zakharyev, D.Dudits (1992): Expression of PVX coat protein gene under the control of extensin-gene promoter confers virus resistance on transgenic potato plants. *Plant Cell Reports* 11: 48-52

Absztraktok és előadások:

- A.Fehér, J.Preiszner, K.Felföldi, D.Dudits (1989) Gene transfer into potato (*Solanum tuberosum* L.): asymmetric somatic hybridization, direct and *Agrobacterium* transformation. (Abstract) Abstracts of the VIth International EUCARPIA Congress on "Genetic Manipulation and Plant Breeding", 1989, Helsingör, Dánia, 95.o.
- A.Fehér, J.Preiszner, K.Felföldi, D.Dudits. (1989) Potentials in use of asymmetric somatic hybridization in crop improvement. (Abstract) In: Proceedings of the Joint Conference of EAPR and the EUCARPIA Potato Section on "Parental line breeding and selection in potato breeding", 1988, Wageningen, Hollandia, eds.

- Louwes KM, Toussaint HAJM, Dellaert LMW (Pudoc, Wageningen), p. 95
- J.Preiszner, A.Fehér, D.Dudits (1989) Selection of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum brevidens* on the basis of vigorous growth after protoplast fusion. (Abstract) In: Abstracts of the Vth Scientific Conference of Socialist Countries on Biotechnology, 1989, Balatonszéplak.
- A.Fehér, J.Preiszner, J.Horváth, R.Gáborjányi, D.Dudits, Z.Király (1990) Characterization of somatic hybrids between tetraploid *Solanum tuberosum* L. cultivars and *S. brevidens* Phil. (Abstract) In: Abstracts of the VIIth IAPTC Congress on "Plant Cell and Tissue Culture", 1990, Amsterdam, The Netherlands, p. 209
- A.Fehér, J.Preiszner, M.Bilgin, J.Györgyey, I.Takács, D.Dudits (1991) Cytological and molecular approaches to reveal X-ray induced chromosome instability in interspecific somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. (Workshop előadás) In: Abstracts of the VIIIth International Protoplast Symposium, 1991, Uppsala, Sweden, Physiologia Plantarum 82: A 26
- A.Fehér, K.G.Skrjabin, E.Balázs, J.Preiszner, O.Shulga, V.M.Zakharyev, D.Dudits (1991): Carrot extensin promoter controlled expression of PVX coat protein gene confers virus resistance in transgenic potato plants. (Abstract) In: Abstracts of the 3d International Congress of The International Society for Plant Molecular Biology on "Molecular Biology of Plant Growth and Development", Tucson, Arizona, 1991.
- J.Preiszner, A.Fehér, D.Dudits (1991) (Előadás) Burgonya szomatikus hibridek előállítása és jellemzése. 4th Hungarian Congress on Plant Physiology, 1991, Szeged

Egyéb publikációk:

- J.Preiszner (1987): Effect of habitat heterogeneity on carabid population on a sandy grassland. Acta Phytopath. Entom. Hung. 22: 433-438

- J.Preiszner, I.Karsai (1988): Carabid fauna of a sandy grassland .
Acta Biol. Szeged. 34: 107-111.
- I.Karsai, J.Preiszner (1989): Diel activity patterns of ground beetles
on a sandy grassland. Proceedings of the 7th European
Carabidologists' Meeting (London) p27.
- J.Preiszner, I.Karsai (1990): Diel activity patterns of ground beetles
on a sandy grassland. In: The role of ground beetles in ecological
and environmental studies (Ed.: Nigel E. Stork) pp. 397-401.
Intercept, Andover, Hampshire.

