

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR SZEGED
BIOKÉMIA TANSZÉK**

A BÚZA GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓJA

Szerző:

Mészáros Attila

Konzulens:

Dr. Pauk János

tud. főmunkatárs

SZEGED

2001

I. A KUTATÁS ELŐZMÉNYEI, 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 termés-mennyiségével vezető helyet foglal el.

A köztermesztésbe vont búza klasszikus nemesítésének korlátozó tényezője a behatárolt génállomány. Új gén bevitele a meglévő génkészlet változatosságának bővítésével segíti elő a növénynemesítés hatékonyságának növelését.

A genetikai transzformációk legtöbbször a közelmúltban kétszikű fajokon végezték *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített génátvitellel. Ezzel a módszerrel az egyszikűek genetikai módosítása gyenge *in vitro* regenerálódó képességük és az *Agrobacterium*-mal szembeni rezisztenciájuk miatt kevésbé sikeres. Az egyszikű fajok, ezek között is a legfőképpen a mezőgazdasági termesztésben fontos gabonaféléknél, fertilis transzgenikus növények előállítására a protoplaszt transzformációs technikák és a mikrorészecskére adszorbált gének belövése bizonyulnak a legeredményesebbnek. Az első transzgenikus gabonaféléket rizs és kukorica éretlen embrió eredetű protoplaszt kultúrájából elektroporációval, vagy polietilén-glikol kezeléssel kapták. A mikrolövedék közvetítette direkt DNS bevitel előnye, hogy a transzformált sejt nem szenved a protoplaszt képzéssel járó sérüléseket, így nagyobb mértékben megőrzi sejtosztódó és – differenciálódó, végső soron növény regenerációs képességét. Növényregenerációt a legkülönbözőbb explantátumok organogenezisével és szomatikus embriogenezisével sikerült megvalósítani. Búza részecskebelövés transzformációs célból a legnagyobb hatékonysággal alkalmazott célszövetek, éretlen embriói és virágzati tengely eredetűek.

Idegen géneknek a recipiens sejtekbe jutását hisztokémiai festéssel kimutatható riporter gén aktivitása, expresszáldásukat, majd integrálódásukat antibiotikum vagy herbicid rezisztenciát okozó marker gének megnyilvánulása alapján lehet igazolni. A búza transzformációs kísérletekben bináris vektorként a β -glükuronidázt (GUS) kódoló *gus* gént, mint riporter gént és a foszfinotricin rezisztenciát (PTA) kódoló *bar* gént, mint marker gént használják.

Búza genetikai transzformációját éretlen embrió eredetű kallusz tenyészetek részecskebelövésével a *gus* és *bar* gének ellenőrzése mellett végzik (Witrens *et al.*, 1998.; Ingram *et al.*, 1999.; Rooke *et al.*, 2000.; Rasco-Gaunt *et al.*, 2001.; Pastori *et al.*, 2001.), a transzgenek stabil megnyilvánulását tekintve egyre eredményesebben.

A magasabbrendű növények fő nitrogén forrása a nitrát. A termésmennyiség hatékony növelése érdekében alkalmazott műtrágyák nitrát feleslege szennyezi a környezetet. Ez mérgezést okozhat, amikor a táplálékláncba kerülve az emésztés során nitráttá redukálódik. A nagyobb terméshozam iránti igénynek és az alkalmazott tápanyag felhasználás környezetkímélő csökkentésének összehangolása a kutatások egyik jelentős területe. Ez a nitrát felvételének és redukációjának alapos és részletes ismeretét is igényli.

A nitrát transzportja – a nitrát felvétel és hasznosítás első lépése – a nitrát környezeti koncentrációjának függvényében kétféle, egymástól kinetikai tulajdonságaikban eltérő nitrát transzporterrel keresztül valósulhat meg. Alacsony nitrát koncentráció mellett egy

szabályozott és nagy affinitású, magasabb nitrát koncentrációnál egy konstitutív és kis affinitású rendszer hatékony. A nitrát asszimiláció sebességkorlátozó lépése a nitrát redukciója nitrátté. A reakciót a nitrátreduktáz enzim (NR; EC 1.6.6.1.-3.). katalizálja, amely három prosztetikus csoportján (FAD – hem – MoCo) keresztül két elektront szállít az elektrondonor NAD(P)H-ról a nitrátra, hogy azt nitrátté redukálja. Az enzim működése transzkripciós, translációs és poszttranszlációs szinten egyaránt ellenőrzött. A szabályozás elsődleges és meghatározó eleme a nitrát koncentráció, de ezen kívül még számos tényező befolyásolja azt: a fény, citokininek, a CO₂ szint, a napi élekciklus, C- és N-tartalmú metabolitok, mint például a szaharóz vagy a glutamin.

A nitrát asszimiláció tanulmányozásának leginkább megfelelő módszere a nitrogén anyagcserében hiányosságot mutató mutánsok vagy transzgenikus növények vizsgálata. A NR csökkent működése miatt az egyedüli nitrogén forrásként nitráton nevelt növények fejlődése gátolt, csak a nitrogén redukált formáinak hasznosításával maradnak életképesek. A NR aktivitás hiányában nem történik meg a nitrát analóg klorát redukciója sem kloráttá. A kloráttal kezelt növény a klorit toxikus tüneteinek hiányában egészséges marad, klorát rezisztensnek bizonyul. Az enzimaktivitás csökkenése-hiánya nitrát auxotrófia és klorát rezisztencia alapján, vagy nitrátreduktáz aktivitás meghatározásával detektálható. A NR hiányos működése kétféle okra vezethető vissza: az apoenzim (*Nia*) struktúrgénjeinek hibájára, vagy a nitrát redukcióját közvetlenül végző MoCo szintézis valamelyik génjének (*cnx*) rendellenességére.

A NR gén transzformációja mindeddig csak kevés faj esetében, túlnyomórészt dohányban volt sikeres, és nincs figyelemreméltó publikált eredmény NR transzgenikus búza vonatkozásában.

Jelen kutatási munka célja egy olyan növény modell létrehozása volt, amely lehetőséget ad annak vizsgálatára, hogy egy adott genetikai elem célzott bevitelével milyen hatékonysággal kivitelezhető és megnyilvánulása milyen szinten és hogyan működik. Munkánkban, a környezetvédelmi vonatkozásban és tápanyag hasznosítási szempontból is fontos nitrát asszimiláció egyik részfolyamatát, a nitrát–nitrít redukciót, katalizáló nitrátreduktáz enzim működését vizsgáltuk. Az enzim molibdén kofaktor szintézisének utolsó lépéséért felelős *cnx1* gén szenz–antiszenz orientációjú módosítása a mezőgazdaságilag kiemelkedő helyet elfoglaló búza transzformációjával történt.

A sikeres gén transzformáció érdekében tanulmányoztuk a nitrát asszimilációját szabályozó és befolyásoló tényezők hatásait modellnövényünkben, a búzában. Kísérleteink első szakaszában célul tűztük ki a nitrát metabolizmusának olyan fokú kísérletes megismerését, mely lehetővé teszi a genetikai transzformáció NR működését befolyásoló paramétereinek optimalizálását. Vizsgáltuk a nitrát, a klorát és a glutamin hatását a nitrát felvételére és redukciójára. 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 genetikai transzformáció módszereként a mai hasonló témájú kutatásokban legnagyobb gyakorisággal használt génbelövést alkalmaztuk. A transzformáció célsejtjeit éretlen embrió eredetű kalluszok képezték. A transzformációs eseményeket *gus* és *bar*

gének megnyilvánulásával követtük nyomon. Kutató munkánk célja a nitrátreduktáz enzim *cnx1* antiszenz génnel transzformált búza előállítása és vizsgálata volt.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Növényanyag

Növényanyagként, 44 búzafajta éretlen embrióból indított sejttenyészetének szövettenyésztetőségi tulajdonságainak összehasonlítása alapján a mexikói származású CIMMYT No.45 tavaszi búzát választottuk. A regenerált sejtekből származó vonal CY 45 jelölést kapott.

2.2. A nitrát asszimiláció vizsgálata

2.2.1. Hidropóniás növénynevelés

A hidropóniás növényneveléshez a növények magjait, felszínsterilizést (2% NaOCl-ben folyamatos 20 perces rázással) követően Petri-csészében, nedves szűrőpapírok között, sötét helyen, 3 napon át csíráztattuk. A csíranövények hidropóniás nevelőedényekbe kerültek, ahol 2 napig csapvizben nőttek, majd 4 napig nitrát mentes nevelő tápoldatra raktuk őket. Ezt követően a kontroll növények ezen az oldaton fejlődtek tovább, a többi egyed pedig 24 órára 0,4 mM illetve 2,0 mM KNO_3 -t tartalmazó indukáló oldatra raktuk. 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 indukciós oldatok összetevőin kívül 1, 3, 5, 7, 10 és 15 mM KClO_3 -t, valamint 0,5 és 3,0 mM Gln-t tartalmaztak külön-külön, illetve a hatóanyagok összes kombinációiban. 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. A kezeléseket 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.

2.2.2. 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 NO_3^- koncentrációját ionszelektív elektróddal határoztuk meg.

2.2.3. 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 növények levelét lemetszettük, és 2-5 mm-es darabokra vágva, 100-120 mg-ot félkémcsőbe, előzetesen inert gázzal (N₂) alaposan átmosott 3 ml extraháló oldatba tettük. A mintákat 2 órán keresztül 25°C-on sötétben, nitrogén atmoszférában inkubáltuk, majd 10 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyeztük. Szobahőmérsékletre hűtöttük, majd a képződött nitrit mennyiségét a hagyományos festési reakciót (PMS-szulfanilamid-NED) követően spektrofotométeren $\lambda = 540$ nm mértük.

2.3. Transzgenikus 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 szemek sterilizését követően az explantátumot 2 mg/l 2,4-diklórfenoxi-ecetsav tartalmú (MS) alaptáptalajra (Murashige és Skoog, 1962) tettük. A 6.-10. napra kifejlődő kalluszokat négy hetes ciklusokban ötször passzáltuk. A kalluszokat MS_{zizi} táptalajon regeneráltuk, amely az alaptáptalaj valamennyi komponense mellett 1-1 mg/l zeatint (ZEA) és indolecetsavat (IES) tartalmazott. A növények gyökereztetése 0,1 mg/ml indolecetsavas MS táptalajon történt.

A *bar* transzgenre 5 mg/ml bialaphos koncentrációjú tápoldattal szelektáltunk. A vélhetően NR transzgenikus 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.

2.3.2. Géntranszformáció

2.3.2.1. Transzformációs vektorok

A búza transzformációjához két vektort használtunk. Az egyik a pAHC25 plazmid volt, amely szelekciós markerként *bar* gént, jelölőként pedig *gus* gént tartalmaz. A plazmid működése az *Ubi-1* promóter ellenőrzése alatt áll. A másik vektor a pRT101 plazmidből alkották meg, és a NR *cnx1* gént antiszenz formációban tartalmazza. A géneket a CaMV 35S promóter hajtja meg. A *cnx1* gén *Arabidopsis thaliana* eredetű.

2.3.2.2. Génbevitel

Az idegen gének beviteléhez a kalluszokat sötét termosztátban, 28°C-on, 2 mg/ml 2,4-D hormonnal kiegészített MS táptalajon neveltük.

A plazmidot hordozó mikrorészecske a Heraeus cég typ. 200-04 aranypor készítménye volt. A mikrorészecskék tisztítását és a DNS felvitelt Sanford és munkatársai (1993) módszere szerint végeztük. A 20 µg plazmid DNS-t állandó hűtés mellett (jég) 200 µl 50%-os gliceriben szuszpendált, előzetesen alkoholban tisztított 12 mg aranypor hordozóra ozmotikumok (200 µl jégen tartott 2,5 M CaCl₂, majd 80 µl hideg 0,1 M spermidin oldat) alkalmazásával vittük fel. Az egyenletes szuszpenziót 9 µl-es cseppekben helyeztük az alkohollal sterilizett hordozó korongokra. Az ilyen módon kapott 20-21 db, a géntranszformációra megfelelően előkészített koronggal az éretlen embrió eredetű mikrokalluszokat az elkészítést követően azonnal belőttük. A plazmidok bejuttatása a PDS-1000/He DuPont részecskebelövő berendezéssel történt.

2.3.2.3. *In vitro* szelekció

A DNS-sel belőtt tenyészeteket 2-3 nappal a belövést követően átraktuk 3 mg/l bialaphost tartalmazó 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 továbbpasszáltuk, 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 tartalmat 1 mg/l-re csökkentettük.

2.3.3. A transzformáció ellenőrzése

2.3.3.1. 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 µl DMSO-t, 940 µl GUS puffert (50 mM foszfátpuffer, pH: 7,5 + 10 mM EDTA + 0,1 % Triton + 0,4 % Sacrosyl) és 40 µl β-merkaptóetanolt tartalmazott. A mintákat 2 órán keresztül 28°C-on inkubáltuk, majd a megfestett kolóniák elhelyezkedése és száma alapján kiértékeltek.

2.3.3.2. Foszfinotricin-acetiltranszferáz enzim teszt

A szelekciós marker hatásának kimutatását kromatográfiai módszerrel végeztük (Spencer, 1990). A 100 mg súlyú mintából 200 µl extrakciós pufferrel kivont extraktumot 50 mM Ac-Koenzim-A és radioaktív PTT 1:1 elegyében 1 órán át, 30°C-on, lassú rázás mellett inkubáltuk. Az így előkészített preparátumot Merck cellulózlemezre vittük fel, és egy éjszakán át 25 ml piridin-, 37,5 ml 1-butanol-, 7,5 ml sósav- és 30 ml H₂O-elegyében futtattuk. A teszt eredményét Kodak X-OMAT filmre exponáltuk, amelyet hagyományos módon hívtunk elő.

2.3.3.3. Nitrátreduktáz aktivitás meghatározás *in vitro*

A nitrátreduktáz aktivitás *in vitro* meghatározása kinetikai módszerrel, a képződött nitrít fotométeres detektálása alapján történt (Pawelczyk, 1993). Az enzimreakció lefutása során a 10., a 20. és a 30. percben történt a mintavétel és a nitrít tartalom mérés. A mérést megelőzően a NR aktivitás indukálása céljából a növényanyagot 48 óráig 15 mM KNO₃ oldattal kezeltük. A dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben homogenizált mintákból 100-120 mg-t felhasználásig Eppendorf csövekben -70°C-on tároltuk

A méréskor a mintákat jégen tartva mindegyikhez négyszeres mennyiségű extrakciós puffert adtunk. A 25°C-ra beállított hőblokkba előkészített Eppendorf csövekbe 775 µl mintapuffer és 15 µl levéladditív elegyéhez fél perces időközönként 165 µl minta extraktumot mértünk, majd 3 alkalommal 10 percenként 300-300 µl mintát vettünk. Az enzimreakciót 25 µl 0,6 M-os cinkacetát oldattal állítottuk le. A képződött nitrít mennyiségét a hagyományos festési reakciót (PMS-szulfanilamid-NED) követően spektrofotométeren $\lambda = 540$ nm mértük.

2.3.4. A növények felnevelése és vizsgálata

2.3.4.1. Az *in vitro* növényállomány felnevelése

A steril körülmények között jól gyökeresedett növénykéket fitotron kamrában, normál talajban magas páratartalom mellett neveltük tovább.

A foszfinotricin rezisztencia vizsgálata céljából végzett herbicides kezelés bialaphos 0,1 %-os oldatával történt. A négy-hat hetes korú növényeken 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.

2.3.4.2. Az utódnemzedékek felnevelése és *in vivo* szelekciója *bar* génre.

Az *in vitro* eredetű, edzett és foszfinotricin rezisztenciára szelektált növények (T₀ nemzedék) agyagcserepekbe (ø 20 cm) normál talajba lettek ültetve, majd üvegházba kerültek, ahol a búza környezeti igényeinek megfelelő klímát biztosítottuk a számukra. Az idegentermekenyülés megakadályozására a növények kalászait a virágzás előtt celofánzacskóval szigeteltük.

A termékeny utódait (T₁ nemzedék) növénynevelő ládáknak, 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.

2.3.4.3. A nitrátreduktáz enzim hatóképességének vizsgálata klorát tesztel

A kloráttal szembeni rezisztencia vizsgálatához a hidropóniás termesztési körülmények között felnevelt, 3 leveles állapotú csíranövények tápoldatát 50 mM-os KClO_3 oldattal 7 mM klorát koncentrációjúra egészítettük ki. A klorátos tápoldatot kétnaponként 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

3.1. A nitrát asszimiláció vizsgálata

3.1.1. A nitrát felvétele

A nitrát indukálta saját felvételét, de koncentrációjának növelésével nem arányos mértékben. A külső nitrát koncentráció 5-szörösére emelése csak 1,3-szoros nitrát felvétel növekedést okozott. A klorát a nitrát felvételére az alacsonyabb nitrát koncentráció mellett (0,4 mM) jelentős hatást nem gyakorolt, a magasabb nitrát koncentrációnál (2,0 mM) viszont a növekvő klorát koncentráció fokozott hatása volt megfigyelhető. Ugyanaz a klorát koncentráció viszonylagosan erősebb gátló hatást okoz a nagyobb nitrát koncentráció melletti nitrát felvételre, mint a kisebb koncentráció mellettiére. A glutamin az alkalmazott kisebb koncentrációban (0,5 mM) nem fejtett ki semmilyen hatást, míg a nagyobb koncentrációban (3,0 mM) a nitrát és a klorát környező mennyiségétől függetlenül megközelítőleg ugyanolyan mértékben gátolta a nitrát felvételét

3.1.2. A nitrát redukciója

3.1.2.1. A nitrát, a klorát és a glutamin hatása

NR aktivitás a nitrát huzamosabb megvonása mellett nem volt detektálható. A nitrát koncentráció növelése (0,4 mM-ról 2,0 mM-ra) a NRA emelkedését váltotta ki. A növekvő klorát koncentráció (1, 3, 5, 7, 10, és 15 mM) arányosan csökkentette a NRA-t mindkét nitrát kezelés esetében. Ugyanolyan klorát kezelés hatására a NRA kisebb mértékben csökkent a nagyobb nitrát koncentráció mellett, mint a kisebb mellett. A glutamin az alkalmazott kisebb kezelés (0,5 mM) hatására is csökkentette a NRA-t, magasabb koncentrációja (3,0 mM) mellett az enzimaktivitás gátlása hatványozottan fokozódott. A klorát és a glutamin együttes alkalmazása a NRA gátlásában hatásuk összegződésében jut kifejezésre.

3.1.2.2. A fény és a napi ciklus hatása

A fény hatásaként a NRA növekedését figyeltük meg a megvilágítási időtartamának emelkedésével. A hatást két különböző tenyésztési tényező (sötét és fény), valamint két különböző szövet (kallusz és növény) kombinációiban vizsgáltuk. A fényen fejlődött és kallusz eredetű minták magasabb NRA értékeket mutattak, mint a többi, míg a legkisebb értékeket következésképpen a sötétben nevelt növényi szövet eredetű mintákból mértük.

3.1.2.3. A nitrátreduktáz enzim kinetikai jellemzése

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 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. A K_m értékek ismeretében kiszámítottuk K_i inhibíciós disszociációs egyensúlyi állandók értékeit, melyek 3 mM ClO_3^- esetén $K_i = 7,97$ mM és 7 mM ClO_3^- mellett $K_i = 7,57$ mM.

3.1.2.4. Az enzimreakció időbeni lefutása

Korai embrió eredetű kalluszszöveten vizsgáltuk a nitrát indukció hatását a NR aktivitás időbeni változására. A nitrátmentes táptalajon (AA) tenyésztett kalluszok válasza a nitrát indukcióra közel háromszoros NRA emelkedést eredményezett, mint a nitrátos táptalajon (MS) neveltéké. A függvénykapcsolatot leíró görbék két lokális maximummal rendelkeznek, csillapodó hullámvonal lefutásúak. A MS táptalajon nevelkedett kallusz eredetű minták esetében laposabb és elnyúltabb, mint az AA táptalajról származókat jellemző görbe. A két hatás közötti különbség feltételezhetően a nitrát hiányában nevelt sejtek erős nitrát indukciójára adott válaszként, a NR túlműködésének tulajdonítható. A görbék hullám jellege a felszaporodott N-metabolitok gátlását jelzi, ami fokozatos konverziójjal arányosan csökken.

3.1.3. A klorát toxikus tünetegyüttes, klorát teszt

A klorát toxikus hatásának megnyilvánulása és a NR működés közötti összefüggés megítélése céljából, 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 kombinációinak hatásaként regisztráltunk. Egy teszt módszert dolgoztunk ki a NRA értékelésére. 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.

3.2. A búza genetikai transzformációja

3.2.1. A búza genotípusa és az explantátum eredete

A vizsgált genotípusok szövettenyésztési tulajdonságait, az embrióképzésre mutatott hajlamukat, kalluszosodó képességüket és a növényregeneráció hatékonyságát hasonlítottuk össze. A kalluszkokat hat cikluson keresztül passzáltuk, majd növényeket regeneráltunk. 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 kalászokból izolált embriókat vizsgáltunk. Úgy találtuk, hogy az embriók érésük korai fázisában alkalmasak kalluszszövet képzésére, míg az érettebbnél redifferenciálódási folyamat indult meg, amit hajtás- és gyökérbérbézés jelez. A kalluszszövetek négyszeri átpasszálás után is megőrizték regenerációs képességüket.

3.2.2. Az idegen gének bevitelére és megnyilvánulása

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. A legkedvezőbb transziens expressziós mintázatnak megfelelően, a belövés irodalmi adatok által javasolt egyéb technikai paramétereinek változtatlansága mellett, a célsejtek és a belöendő részecskék közötti távolságot 12 cm-re állítottuk be.

A belőtt kalluszkokat hat-nyolc hónapig öthetenkénti passzállással bialaphos tartalmú táptalajon tenyésztettük. A *bar* gén megnyilvánulását, a foszfinotricin herbicid hatását túlélő sejtek mutatták, melyet a PAT enzim kromatogramja alapján ellenőriztük. A rezisztens kalluszkokból tíz növénykét sikerült regenerálni, melyek mind foszfinotricin rezisztensnek bizonyultak. Az öntermékenyítéssel továbbzaporított növényekből hat herbicid rezisztens vonalat kaptunk.

3.2.3. A transzgenek 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 T_0 nemzedék hat fertilis egyedének utódait egy-egy transzgénikus vonalként (106-3a, 116, 117, 124, 128 és 129) üvegházban neveltük tovább. Az öntermékenyítéssel előállított T_1 generáció egyedeit a foszfinotricin rezisztencia öröklődésének vizsgálata céljából foszfinotricin hatóanyagú totális gyomirtószerrel (Finale 14 SL) permeteztük

Az utódok átlag 75 %-át találtuk rezisztensnek. Ez arra utal, hogy a *bar* gén az utódnemzedékben 3:1 arányban hasadt. Ebből következik, hogy a *bar* gén a mendeli öröklésment szerinti egyénes beépülésű, és domináns öröklődésű.

3.2.3.2. A transzgénikus növények nitrátreduktáz aktivitás vizsgálata

A *bar* génre transzgénikusnak talált hat növényegyedből indított vonalak T_1 nemzedékét a *cnx1* gén antiszenz megnyilvánulását keresve vizsgáltuk tovább. A minták NRA értékei azt mutatták, hogy a hat vonal közül kettő (a 117 és a 124) mutat szignifikáns NRA csökkenést. A többi vonal esetében a kotranszformáció hatékonysága lényegesen alacsonyabb volt. A *cnx1* antiszenz gén öröklődését a T_2 nemzedékben továbbvizsgálva mindkét vonal esetében a NRA magasabb értékeket mutatott a T_1 nemzedékhez képest. A transzgén átöröklése heterogén, nem minden esetben történt meg.

3.2.3.3. A transzgénikus növények klorát rezisztencia vizsgálata

A *cnx1* antiszenz transzgén megnyilvánulását a T_2 nemzedékben klorát teszttel is vizsgáltuk. A két T_1 nemzedékben csökkent NRA-t mutató vonal közül 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. Ugyanakkor a kontroll CY-45 növényekhez képest mindkét vonal esetében nagyobb klorát toleranciát tapasztaltunk. A klorát teszt eredményei arra engednek következtetni, hogy a két transzgénikus vonal T_2 utódnemzedékében fellelhetőek a *cnx1* antiszenz transzgén megnyilvánulását a NR csökkent működésével jelző egyedek. A 117 vonal klorát toxicitásában mutatott heterogenitása a transzgén nagyfokú szegregációjára utal. A 124 vonal esetében a transzgén hatása egységesebb és kifejezettebb.

4. ÚJ KUTATÁSI EREDMÉNYEK

- A nitrát és a klorát transzportja egymástól független rendszeren keresztül történik
- A klorát különböző mechanizmussal hat a nitrát felvételére és redukciójára. A nitrát felvételére csak nagy koncentrációban hat, a nitrát redukció pedig a klorát/nitrát aránytól függ. A klorát a nitrátreduktáz kompetitív inhibitora
- A NRA napi ciklus szerinti változás miatt, a mintavételt a napnak ugyanabban az időszakában kell végezni. a NRA meghatározás reprodukálhatósága miatt.

- A nitrát fokozottabb hatást fejt ki a nitrát mentes tápközegben nevelt sejtek NR indukciójára, mint a nitráton tenyésztetkére.
- 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 magas herbicid hatóanyag koncentráció (3-5 mg/l) hosszú időtartamú használata (6-8 hónap) megbízható és jó hatékonyságú módszer transzgenikus sejtek *in vitro* szelekciójára.
- A foszfinotricin rezisztenciát kódoló *bar* gén expresszióját PAT teszttel bizonyítottuk.
- A *bar* gén integrálódását a T₁ nemzedékben megjelenő herbicid rezisztencia igazolja, ami egygénés domináns öröklődést mutat.
- A *cnx1* antiszenz gén hatásaként csökkent a nitrátreduktáz aktivitás színje 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.

5. JAVASLATOK AZ EREDMÉNYEK FELHASZNÁLÁSÁRA

- A nitrát asszimilációját szabályozó és befolyásoló tényezők hatásának tanulmányozása és pontos megismerése búzában megteremti a lehetőségét a NR működését irányító gének szenz-antiszenz módosítását célzó genetikai transzformáció paramétereinek pontos tervezéséhez.
- A klorit mérgezés tüneteinek objektív bírálatán alapuló klorát teszt megfelelő módszer NR aktivitások közötti különbségek szemikvantitatív értékelésére.
- Az éretlen embrió eredetű mikrokalluszok *gus*, *bar* és *cnx1* antiszenz génekkel végrehajtott génbelövéses transzformációjának sikere megfelelő tudományos alapot és gyakorlati tapasztalatot ad egyéb hasznos gének transzformációjához búzában.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN ÍRT PUBLIKÁCIÓK

- Mészáros, A.** (1988): Nitrate reductase in Higher Plants "International Course on Biotechnology" 1998, Rehovot Israel.
- Pauk, J.- Hänsch, R.- Schwarz, G.- Nerlich, A.- Monostori, T.- Mészáros, A.- Jenes, B.- Kertész, Z.- Matuz, J.- Schulze, J.- Mendel, R. R.** (1989): Transzgénikus búza (*Triticum aestivum* L.) előállítás Magyarországon. *Növénytermelés*, 47: 241-251.
- Pauk, J.- Mihály, R.- Mészáros, A.- Hänsch, R.- Mendel, R. R.** (1999): Transformation of foreign genes and sexual transfer of transgenes in wheat. NATO workshop In: „Use of agricultural important genes in agricultural biotechnology.” Oct. 17-21, 1999., Szeged
- Mészáros, A.- Pauk, J.** (2000): Nitrátredukció magasabb rendű növényekben. *Növénytermelés*, 49/: 431-446.
- Hasan, M.- Pauk, J.- Jankulosky, L.- Gyuris, K.- Kertész, Cs.- Bánhid, J.- Mészáros, A.- Tóth-Lőkös, K.- Falusi, J.- Petróczi, I.- Kertész, Z.** (2002): Az androgenézis és termőképesség genetikai hátterének összehasonlító elemzése búzában. *Növénytermelés*, (megjelenés alatt)
- Mihály, R.- Petrecz, Sz.- Kótai, É.- Kiss, O.- Mészáros, A.- Talpas, K.- Gelencsér, É.- Kertész, Z.- Pauk J.** (2002): Transzformált idegen gén sejtszintű szelekciója és a transzgénikus vonal szabadföldi kibocsátása. *Növénytermelési Napok 2002. febr. 12-13.* MTA, Budapest
- Mészáros, A.- Pauk, J.** (2002): The effect of nitrate, chlorate and glutamine on nitrate assimilation in wheat. *Environmental and experimental botany*, (megjelenés alatt)
- Mészáros, A.- Pauk, J.** (2002): Chlorate resistance as a tool to study the expression of nitrate reductase antisense gene. *Cereal Research* (megjelenés alatt)