SZENT ISTVÁN EGYETEM

A szárazság-specifikus *DS2* gén funkciójának és szabályozásának vizsgálata *Solanaceae* fajokban

Doktori értekezés tézisei

Dóczi Róbert

Gödöllő
2003

A doktori iskola: Növénytudományi Doktori Iskola

Tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
Vezetője:	Dr. Virányi Ferenc egyetemi tanár, az MTA doktora Szent István Egyetem Növényvédelemtani Tanszék
Ttkára	Dr. Gyulai Gábor gyetemi docens, a biológiai tudomány kandidátusa zIE, Genetika és Növénynemesítés Tanszék ödöllő
Program:	Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel
Programvezető:	Dr. Heszky László egyetemi tanár, akadémikus Szent István Egyetem Genetikai és Növénynemesítési Tanszék
Témavezető:	Dr. Bánfalvi Zsófia tudományos főmunkatárs biológiai tudományok kandidátusa Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

--- ---

Az iskolavezető jóváhagyása A programvezető jóváhagyása

A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS

Az élet, majd a növényi élet is, vízben jött létre. A víz különleges kémiai tulajdonságai elengedhetetlenek az életfolyamatok működése szempontjából. A víz neutrális oldószer, kiváló kolloidképző közeg (a makromolekulák körüli hidrátburok gátolja azok összetapadását), hidrogénhíd kötéseket képes kialakítani, fontos redox ágens (a fotoszintézis végső elektrondonora a víz), nagy faj- és párolgáshője pedig a hőháztartás szempontjából fontos.

A szárazföldi életmódhoz alkalmazkodás komoly evolúciós kihívást jelent a növényvilág számára. A fotoszintézis az elnyelt fényenergia mennyiségétől függ, amit az asszimiláló felület növelésével lehet fokozni. A szárazföldön azonban a felület növelése a párolgással elveszített víz mennyiségét is növeli, ami viszont, - az élőhelyektől függően különböző mértékben ugyan - de korlátozottan áll rendelkezésre. Ehhez a kényszerhelyzethez való alkalmazkodás eredményeként alakult ki a szárazföldi növények vízgazdálkodási képessége, létrejött a vízfelszívást végző gyökérrendszer, a vízleadást végző levélzet és a kettő közötti összeköttetést biztosító szállítórendszer. A vízgazdálkodás egyensúlyát a morfológiai alkalmazkodás különböző módozatain túl, összehangolt élettani és biokémiai folyamatok biztosítják.

Kedvezőtlen környezeti feltételek között a vízgazdálkodás egyensúlya megbomolhat. Ilyenkor leáll a sejtosztódás, a sejtnövekedés és több fontos makromolekula szintézise, összességében csökken a növekedés mértéke. Ennek oka többek között a fotoszintézis csökkenése, mivel a sztómák bezáródásával csökken az asszimilálható CO_2 mennyisége, a sejtek ultrastruktúráinak károsodásával pedig csökken az enzimek aktivitása. Ezen kívül a vízmozgás csökkenése a tápanyagok mozgását is korlátozza, és a nitrogén-anyagcsere károsodásának következtében, a fehérjeszintézis mértéke is csökken.

Globális méretekben a mezőgazdasági termelés egyik legfontosabb korlátozó tényezője a vízhiány. Becslések szerint a világ növénytermesztését érő aszálykár mértéke meghaladja az évi tízmilliárd dollárt. Az Egyesült Államokban 1978 és 1995 között a szárazság számlájára írható átlagos termésveszteség minden évben meghaladta az 1,2 milliárd dollárt. 1995 óta három különösen aszályos év sújtotta az Államokat. Az 1999-es aszály csak a keleti országrészben 1,2 milliárd dollárnyi bevételtől fosztotta meg a farmereket. Az 1998-as aszály által okozott kár becsült mértéke 6-9 milliárd dollár volt, míg az 1995 őszétől 1996 nyarán végig sújtó aszály 5 milliárd dollárnyi mezőgazdasági veszteséget okozott.

Közismert, hogy aszálykárok a magyar mezőgazdaságot is gyakran érik. Az viszont talán kevésbé ismert, hogy ha a jelenleg tapasztalható kedvezőtlen folyamatok nem változnak, és a globális felmelegedés továbbra is ilyen ütemben folytatódik, úgy ötven éven belül

az Alföld teljesen kiszáradhat, elsivatagosodhat. Az ENSZ élelmezésügyi világszervezete, a FAO, a közelmúltban a magyar Alföldet egy hosszú távú előrejelzési térképen a félsivatagi övezetbe sorolta.

Az éghajlatváltozás természete, jelentősége, tényleges veszélyei nem egyértelműek, s ezért ezek gyakran heves viták tárgyát képezik. A káros környezeti tényezők azonban, így a vízhiány terméskorlátozó hatásai, már a jelenlegi helyzetben is komoly kihívást jelentenek a modern mezőgazdaság számára. Ennek oka az ún. „zöld forradalom" kifulladása. A 90-es években az élelmiszertermelés növekedési rátája már kisebb volt, mint az emberi populációé. Amennyiben ez a trend nem változik nagyobb termés-potenciálú és termés-stabilitású fajták kialakításával, úgy a XXI. században komoly élelmiszerhiányok következhetnek be. Új lendületet adhat a zöld forradalomnak a biotechnológia, és különösképpen a génsebészet, mellyel a hagyományos növénynemesítés lehetőségei nagymértékben kitágíthatóak. A termesztett fajták tulajdonságainak ugrásszerű javulása pedig hatékonyabb agrotechnikai eljárások alkalmazását teszi lehetővé. Az USA-ban, és néhány más országban, már jelenleg is több tízmillió hektáron termesztenek genetikailag módosított, rövidítve GM, fajtákat.

Ismereteink a szárazságtűrés biológiájáról rohamosan bővülnek. A stressz-adaptáció bonyolult mechanizmusának egyik fontos része a metabolikus folyamatok átalakítása. A metabolikus folyamatok mesterségesen egyrészt idegen gének beépítésével, másrészt a szabályozó folyamatok optimalizálásával módosíthatók. Mindkét megközelítéssel

sikerült már termesztett növények stressztűrő képességét génsebészeti úton jelentős mértékben javítani. Ezekkel az eljárásokkal nemcsak a termésmennyiség fokozható, hanem annak minősége is, de kitolhatóvá válnak a termesztésbe vonható területek földrajzi határai is. Környezetvédelmi szempontból nem elhanyagolható az öntözési igény csökkentése sem. Amennyiben a GM fajták beváltják a hozzájuk fűzött reményeket, és elterjedésük általánossá válik, úgy a fokozott szárazságtűrésű fajtáknak minden bizonnyal fontos szerep jut majd a jövő mezőgazdaságában.

A gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológia Kutatóközpontban a Dr. Bánfalvi Zsófia által vezetett Növényi Molekuláris Biológia csoportban, a *DS2* gén izolálásával Silhavy Dániel kezdte el a vízhiány molekuláris biológiájával kapcsolatos kutatásokat. Mivel a stressz-toleráns fajták biotechnológiai előállítása stressz-indukálható promotereket igényel, a *DS2* indukciójának vízhiány-specifikus természete a gén szabályozásának vizsgálatára irányította a figyelmet. Ekkor csatlakoztam PhD hallgatóként a csoportban folyó stresszkutatási munkákhoz. Jelen dolgozatom az e területen végzett kísérleteim eredményeit foglalja össze.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A vízhiány hatása a burgonya termesztésére

Kísérleti növényünk a burgonya (*Solanum tuberosum* L.), amely hazánkban a gabonafélék után a legfontosabb kultúrnövény. Szántóföldi körülmények között termésátlagát erősen befolyásolja számos környezeti tényező: a különböző kártevő és kórokozó szervezetek által okozott károk mellett a vízhiány és a magas hőmérséklet gyakran okoznak jelentős termésveszteséget. A termesztett burgonyafajták alapvetően az Európa és Amerika északi területein uralkodó, hűvös és csapadékban gazdag éghajlathoz akklimatizálódtak (VAYDA 1994). A legtöbb fajta termesztéséhez az optimális hőmérséklet 17-20°C. Ezen felül minden további 5°C emelkedés 25%-kal csökkenti a fotoszintetikus rátát (BURTON 1981, DEMAGANTE et al. 1988). A hőmérséklet emelkedését legtöbbször a csapadék mennyiségének csökkenése kíséri. BEGG et al. (1976) szerint a burgonya sokkal érzékenyebb a talaj vízellátottságára, mint a legtöbb haszonnövény.

Amikor az érkező víz mennyisége kisebb, mint az evapotranspiráció során elvesztett vízé, a termésveszteség és a talajnedvesség csökkenése között lineáris kapcsolat mutatható ki (SHIMSHI et al. 1985). A vízhiány minden fejlődési stádiumban

csökkenti a fotoszintézis hatékonyságát és ezáltal a gumófejlődést, de a gumózás kezdeti szakaszában bekövetkező szárazságnak különösen erős hatása van a terméshozamra. Ilyenkor leáll a sztóló képződés (HAVERKORT et al. 1990) és a gumó kezdemények kialakulása is (MACKERRON et al. 1988a). A már kialakult gumókezdemények növekedése is drámaian csökkenhet. A bennük felhalmozott szárazanyag mennyiségének csökkenése mind a stressz erősségével, mind annak időtartamával arányos (VAN LOON 1981; MACKERRON et al. 1988a, MACKERRON et al. 1988b).

2.2. A vízhiány által kiváltott élettani és molekuláris válaszok

A mérsékelt övi növények a nem biotikus eredetű stresszek közül leggyakrabban a vízhiánynak, illetve a szélsőségesen hideg vagy meleg hőmérsékletnek vannak kitéve. A vízhiány mértékének megfelelően HOEKSTRA et al. (2001) szerint a károsodásnak, és az ezzel szembeni tolerancianak, két, biokémiailag alapvetően eltérő módja különböztethető meg. [1] Kb. 23% víztatartalomig a szabad citoplazmás víz veszik el. Az ilyen mértékű szárazságnak ellenálló rendszerek a makromolekulák hidrátburkát képesek úgy stabilizálni, hogy azok konformációja ne változzon lényegesen. [2] A további vízvesztés túléléséhez a hidrátburok vízmolekuláit kell hidrogénhíd kötések kialakítására képes más molekulákkal helyettesíteni. A majdnem teljes kiszáradás (deszikkáció)

túlélésének képessége gyakori a növényvilágban: mohák, páfrányok, ezek spórái; magasabb rendű növények pollenje és magjai; és bár ritkán, de bizonyos egész zárvatermő növények is rendelkeznek ezzel a képességgel. Ez utóbbiak az egyes száraz területeken élő, ún. poikilohidratúrás növények, amelyeket az angol nyelvű irodalomban „resurrection plants”-nak, azaz „feltámadó” növényeknek neveznek. Ezek képesek ellenállni a majdnem teljes kiszáradásnak, majd rehidratációval gyorsan visszanyerik életfunkcióikat. Közülük a leginkább tanulmányozott faj a *Craterostigma plantagineum* (Scrophulariaceae), amelynek deszikkáció során beinduló molekuláris mechanizmusait részletesen is jellemezték (CHANDLER et al. 1999).

A növényekben az evolúció során kialakult számos élettani és biokémiai védekező mechanizmus működését a génexpressziós mintázat jelentős átalakulása biztosítja. Az utóbbi 10-15 év során különböző növényfajokból jó néhány, a szárazság hatására indukálódó gént írtak le (összefoglaló: CUSHMAN et al. 2000, TABAEIZADEH 1998, BRAY 1997, SHINOZAKI et al. 1997; INGRAM et al. 1996). Egy nemrég megjelent közlemény arról számol be, hogy 1300 microarray analízissel vizsgált *Arabidopsis* cDNS közül mintegy 44 expressziós szintje mutatott emelkedést vízvesztés hatására, amelyek közül 30-at még nem írtak le korábban (SEKI et al. 2001). A vízvesztés során indukálódó gének termékei a következő feladatokat látják el (BRAY 1997, BRAY 1993): [1] Enzimfunkcióval nem rendelkező fehérjék és kis molekulasúlyú vegyületek, amelyek egyaránt biztosíthatják a membránok és egyéb

makromolekulák stabilitását és a vízvisszatartó képesség fokozását (LEA, chaperone, proteáz gátló fehérjék, ozmolitok). [2] A felesleges ionok megkötése (LEA). [3] A vízszállítás hatékonyságának javítása (aquaporinok). [4] A feleslegessé váló, vagy súlyon károsodott fehérjék eltávolítása (ubiquitinek, proteázok).

2.2.1. *LEA fehérjék*

A növények szárazságtűrésének érdekes aspektusa, hogy a kiszáradás túlélésének genetikai potenciálja jelen van bennük, mivel a legtöbb faj szaporodása során a keletkező magok ténylegesen kiszáradnak, majd a csírázást megelőzően rehidratálódnak. Így nem meglepő, hogy a vízvesztés során indukálódó gének közül sok indukcióját leírták az embriógenezis során is. A szárazság-indukált gének egyik nagy csoportjának neve is innen származik: Late Embryogenesis Abundant (LEA) fehérjék. A LEA fehérjék szélesen elterjedtek a növényvilágban. Közös tulajdonságuk magas hidrofilicitásuk és vízoldhatóságuk, amelyet gyakran még forralás után is megőriznek. Homológiájuk, konzervált aminosav doménjeik, általános jelenlétük és expressziójuk specificitása arra utal, hogy alapvető feladatuk lehet a szárazságtűrés kialakításában, ami feltehetőleg a citoplazma makromolekuláris struktúráinak védelme. Ennek alátámasztására azonban kevés kísérleti adat áll rendelkezésünkre. Az árpa *HVA1* génjének kifejeztetése transzgénikus rizs növényekben,

azok só és hidegtűrésének javulását okozta (XU et al. 1996). A LEA gének expresszióját indukáló transzkripciós faktorok konstitutív termeltetése szintén jelentősen növeli a növények toleranciáját különféle stresszhatásokkal szemben (JAGLO-OTTOSEN et al. 1998, KASUGA et al. 1999). Érdekes megjegyezni, hogy a LEA-szerű fehérjék génjei a növényvilágon kívül is megtalálhatóak és legtöbbször ozmotikus stressz hatására indukálódnak (GARAY-ARROYO et al. 2000) pl. élesztőben, cyanobaktériumban (CLOSE et al. 1993) és nematódában is (BROWNE et al. 2002).

2.2.2. *Aquaporin fehérjék*

A sejtes vízszállítás fontos szereplői az aquaporin fehérjék (MAUREL et al. 2001), amelyek a csatorna fehérjék egy komplex családját képezik. Ezek a fehérjék a víz mozgását segítik elő a transzmembrán vízpotenciál gradiensek mentén, és akár 10-20-szoros vízpermeabilitás emelkedést is eredményezhetnek. Expressziójukat és aktivitásukat a vízellátottság szabályozza. Számos aquaporin gént a dehidratáció indukál, ilyen például az *Arabidopsis rd28* gén (YAMAGUCHI-SHINOZAKI et al. 1992), vagy a paradicsom *TRAMP* gén (FRAY et al. 1994). *C. plantagineum*-ban is számos aquaporin gén indukálódik a kiszáradási folyamat során (MARIAUX et al. 1998).

2.2.3. *Ozmolitok és oldható cukrok akkumulációja*

A növények az ozmotikus potenciál fenntartását speciális alacsony molekulasúlyú szerves vegyületek, ozmolitok szintézisével biztosítják. Ilyen ozmolit például a prolin, trehalóz, glicin-betain, mannitol, szorbitol, fruktán (BOHNERT et al. 1995). Ezek a molekulák rendkívül vízoldhatóak és a sejt normális funkcióival szemben neutrálisak, még igen magas koncentrációkban is (YANCEY et al. 1982). Eleinte úgy gondolták, hogy feladatuk elsősorban az, hogy ozmotikus hatásuknál fogva segítsék a sejtek turgorának fenntartását. Az újabb kísérleti eredmények viszont azt mutatják, hogy már az ozmotikus hatás kialakításánál alacsonyabb koncentráció mellett is javítják a stressz-toleranciát. Szerepük valószínűleg inkább a dehidratálódott makromolekulák szerkezetének stabilizálása, mint ahogy azt az *in vitro* kísérleti eredmények is igazolták (SANTORO et al. 1992, PAPAGEORGIOU et al. 1995, HOEKSTRA et al. 2001).

Vízhiány következtében a prolin szintézist végző *P-5-CS* gén indukálódik. Ezzel párhuzamosan a lebontó enzim génjének (*ProDH*) aktivitása csökken, így a sejtek prolintartalma emelkedik (YOSHIBA et al. 1997). A *P-5-CS* gén konstitutív termeltetése (KAVI KISHOR et al. 1995) és antiszensz gátlása (NANJO et al. 1999) egyformán azt bizonyítják, hogy ez a vegyület fontos szerepet játszik az ozmotolerancia kialakításában.

Régóta ismert, hogy a nem redukáló diszacharid, a trehalóz, magas koncentrációban fordul elő olyan szervezetekben (pl. élesztő), amelyek képesek a teljes kiszáradást túlélni (CROWE et al. 1992), és bár a magasabb rendű növényekben fölhalmozódása ritka, jól kimutatható mennyiségben megtalálható néhány poikilohidratúrás növényben is. A trehalóz i*n vitro* hatékonyan képes dehidratált enzimeket és lipid membránokat stabilizálni (CROWE et al. 1992, COLACO et al. 1992). HOLSTRÖM et al. (1996) a *RUBISCO* kis alegység génjének promoterével élesztő trehalóz–6-foszfát-szintáz (*TPS1*) gént fejeztettek ki transzgénikus dohány növényekben. A transzgénikus növények szárazságtoleranciája jelentős mértékben megnőtt. Érdemes azonban megjegyezni, hogy optimális fejlődési körülmények között e növények növekedési rátája 30-50% csökkenést mutatott, így a szerzők stressz-indukálható promoterek alkalmazását javasolják a gyakorlatban is alkalmazható növényfajták előállítására.

A glicin-betain rendkívül hatékony ozmolit, amelynek termelésére rendszertanilag nagyon távoli fajok is képesek, így egyes, főleg száraz és sós területeken élő, magasabb rendű növények is. Sok mezőgazdaságilag fontos növény azonban nem termel glicin-betaint. Már több mint tíz azoknak a közleményeknek a száma, amelyekben transzgénikus növények stressz-ellenállóságát glicin-betain szintézisével növelték (SAKAMOTO et al. 2001). Mint azt több esetben is megállapították, a transzgénikus növények glicin-betain koncentrációja túl alacsony volt ahhoz, hogy védőhatásukat ozmoregulátorként fejtsék ki. Sokkal valószínűbb tehát,

hogy a glicin-betain a membránok és komplex fehérjék stabilizálásában játszik szerepet.

Cukor-alkohol típusú molekulák, mint a mannitol (TARCZYNSKI et al. 1993, SHEN et al. 1997), a szorbitol (TAO et al. 1995, SHEVELEVA et al. 1998) és a D-ononitol (SHEVELEVA et al. 1997) transzgénikus szintézisére is több próbálkozás történt. A kedvező hatások mellett ezek az eredmények ugyanakkor arra is felhívják a figyelmet, hogy a transzgén által szintetizált metabolitok túl magas koncentrációban, vagy nem megfelelő szubcelluláris lokalizációval károsítóan hathatnak a növényekre.

A szacharóz-szintáz (*Sus*) és a szacharóz-foszfát-szintáz (*Sps*) gének által kódolt enzimek a szacharóz-szintézis kulcsenzimei. E gének vízvesztés során történő indukcióját több esetben leírták (PELAH et al. 1997, DEJARDIN et al. 1999, GEINBERGER et al. 1999), ami egybecseng azzal, hogy a növényekben vízvesztés hatásárára oldható cukrok halmozódnak fel. A szárazságtűrő *C. plantagineum* vízvesztés során 8 szénatomos cukorforrását, a 2-oktulózt, átalakítja szacharózzá (BIANCHI et al. 1991), amit a *Sus* és *Sps* gének indukciója kísér (INGRAM et al. 1997, KLEINES et al. 1999). Az oldható cukrok szerepe a stressz-válaszban, ozmotikus aktivitásuk mellett, akárcsak az ozmolitoknak, fehérje stabilizáló képességük lehet (CARPENTER et al. 1990).

2.2.4. *Oxidatív stressz*

Vízhiány következtében a sztómák bezáródnak, az elérhető CO_2 mennyisége csökken, a fotorendszerekben áramló elektronok elszabadulhatnak, és az oxigénnel reaktív oxigéngyököket képezhetnek. Így tehát a vízhiány következtében oxidatív stressz léphet fel (TABAEIZADEH 1998). A növények számos mechanizmussal rendelkeznek az oxidatív stressz elleni védekezéshez, mivel az sok más biotikus (kórokozok) és abiotikus eredetű stressz (hideg, hő, magas fényintenzitás, egyes herbicidek) következményeként is kialakulhat. A reaktív oxigéngyökök ellen két alapvető védekezési mechanizmus alakult ki. [1] Az oxigéngyökök átalakítása történhet enzimatikus úton: ilyen enzimek a szuperoxid dizmutázok, katalázok. peroxidázok. [2] A reaktív oxigéngyökök eltávolítását azok megkötésével „gyökfogó” molekulák is végezhetik, mint pl. a redukált glutation, aszkorbinsav, poliolok, szénhidrátok, tokoferol. Az enzimatikus mechanizmusok hatékonysága lényegesen érzékenyebb a hidratáltság fokára, mint a nem enzimatikusoké (HOEKSTRA et al. 2001). Transzgénikus növények ozmotikus stressz ellenállóságát mind enzimatikus (MCKERSIE et al. 1996), mind gyökfogó (ROXAS et al. 1997) természetű mechanizmussal sikerült már javítani.

2.2.5. *Toxikus termékeket hatástalanító mechanizmusok*

A vízhiány következtében károsodott makromolekulák lebomlásakor toxikus hatású termékek is keletkezhetnek. Az ezeket hatástalanító mechanizmusok szintén hozzájárulhatnak a tolerancia fokozásához. A lipid lebomlás eredményeként például káros lipid-aldehidek keletkezhetnek. OBERSCHALL et al. (2000) lucerna eredetű aldóz-reduktáz enzimet konstitutív promoterrel fejeztettek ki transzgénikus dohánynövényekben. Ez az enzim a lipid-aldehideket nem károsító lipid-alkoholokká alakítja, és így a transzgénikus növények jelentős stressz-toleranciát mutatnak.

2.3. A génexpresszió szabályozása vízhiány során

Minden élőlény adaptív mechanizmusainak alapvető tulajdonsága, hogy külső hatásra indukálódik, és így a szervezet erőforrásait csak szükség esetén mozgósítja. Ennek megfelelően a növények számos mechanizmust fejlesztettek ki, amelyekkel a környezeti stresszhatásokat érzékelik, a jelzéseket közvetítik, összehangolják, hogy rájuk a megfelelő módon reagáljanak. A különböző környezeti hatások többféle jelátviteli, ún. szignál transzdukciós úton keresztül szabályozzák a génexpresszió mintázatát. Ezek a szignál transzdukciós utak számos helyen

kapcsolódnak egymáshoz, aminek következtében egy jelátviteli hálózat jön létre.

2.3.1. *A vízhiány érzékelése*

A vízhiány többféle fizikai változást okoz, mint például a csökkenő vízpotenciál, csökkenő turgor, kis és makromolekulák koncentrációjának változása, vagy a sejt térfogatának változása. A molekuláris szintű válaszfolyamatokat ezek felismerése indíthatja el (HSIAO 1973).

Alacsonyabbrendű szervezetek ozmoérzékelési mechanizmusait genetikai mutánsok felhasználásával vizsgálták. *Escherichia coli*-ban 30 különféle, ún. „két-komponensű” rendszer (two-component system) - egy szenzor és egy válasz regulátor (response regulator) - végzi a környezeti állapotok felismerését (MIZUNO 1998). A szenzor, így az ozmoszenzor EnvZ is, egy membránfehérje, amely aktiválásakor a jelet intracelluláris hisztidin autokináz doménjén keresztül továbbítja. A foszfát csoport azután a válasz regulátorban a hisztidinről egy aszparaginsav aminosavra kerül. Az ozmoérzékeléskor aktiválódó válasz regulátor, az OmpR, egy DNS-kötő fehérje, amely két külső membrán porin fehérje, az ompF és az ompC transzkripcióját szabályozza.

Hasonló két-komponensű rendszer működik *Saccharomyces cerevisiae*-ben is. A folyamat azonban amit elindít, már egy többlépcsős His-Asp foszfotranszfer folyamat (OHTA et al. 1993). Az élesztő Sln1

fehérje egy ozmoszenzor, amely a két-komponensű rendszer mindkét komponensét egy fehérjében tartalmazza. Amikor az Sln1 ozmotikus stresszt érzékel, inaktiválódik, ez pedig közvetve egy MAP kináz kaszkádot (lásd később) aktivál (WURGLER-MURPHY et al. 1997). Ehhez a MAP kináz kaszkádhoz élesztőben egy másik, független ozmoszenzor, a Sho1 fehérje is kapcsolódik (MAEDA et al. 1995).

Feltehetőleg a növényekben is az élesztőéhez hasonló érzékelési mechanizmusok működnek. URAO et al. (1999) egy, az Sln1-hez hasonló két-komponensű érzékelő molekula génjét (*ATHK1*) írták le *Arabidopsis*-ból. Az ATHK1-nek két transzmembrán doménje, egy hisztidin-kináz doménje, és egy, a válasz regulátorokhoz hasonló doménje van. Az *ATHK1* komplementálja az élesztő *SLN1* mutánst. URAO et al. (2000a) három potenciális foszforilációs közvetítő fehérje (phosphorelay intermediate) génjét (*ATHP1-3*), és 4 potenciális válasz regulátor (*ATRR1-4*) génjét klónozták, amelyek közül az ATHP1 élesztő két-hibrid rendszerben képes együttműködni az ATHK1 fehérjével. Ez alátámasztja az élesztő-szerű modell létezését, amit ugyanakkor azonban megkérdőjelez az a tény, hogy az ATHP1 két másik ismert növényi hisztidin-kinázzal is képes együttműködni, míg az URAO et al. (2000a) által klónozott ATRR fehérjék egyikével sem. Egy élesztő-szerű rendszer működését mégis elképzelhetővé teszi az a tény, hogy az *Arabidopsis* genom sok más olyan annotált szekvenciát tartalmaz, amelyek válasz regulátorokat kódolhatnak (URAO et al. 2000b).

2.3.2. *A vízhiány szignáltranszdukciója*

A növényvilágban számos jelmolekula, és szabályozó fehérje végzi a különböző környezeti szignálok továbbítását. Ilyen jelmolekulaként vált ismertté pl. a kalcium ion, a cGMP, a NO, lipidek, vagy éppen a különböző növényi hormonok, közöttük a stressz-válasz szabályozásában kiemelkedően fontos abszcizinsav (ABA). A szabályozó fehérjék közül a legfontosabbak a protein foszforilációt és defoszforilációt végző kinázok, illetve foszfatázok.

2.3.2.1. MAP kinázok

Élesztőben és állatokban a MAP (mitogen-activated protein) kináz kaszkádok jól ismert szignáltranszdukciós mechanizmusok, amelyek párhuzamosan képesek különböző jeleket továbbítani, és így a sejtciklust, vagy éppen a stresszválaszokat, szabályozni. A MAP kinázok (MAPK) aktivizálását MAPK-kinázok (MAPKK), azok aktiválását pedig MAPKK-kinázok (MAPKKK) végzik. Ez utóbbiak több-kevesebb áttétellel a plazma membrán szenzor molekulákkal állnak kapcsolatban (BÖGRE et al. 2000). MAP kinázok növényekben is találhatóak, közöttük olyanok is, amelyeket ozmotikus stressz aktivál. ICHIMURA et al. (2000) három olyan MAPK-kinázt írtak le, amelyek *Arabidopsis*-ban só, hideg, sebzés és egyéb környezeti szignálok hatására enzimatikusan aktiválódnak. Lucerna sejtekben a „salt-stress-inducible MAP kinase” (SIMK)

aktiválódik ozmotikus stressz hatására (MUNNIK et al. 1999). Dohányban egy hasonló MAPK aktiválódik ozmotikus stressz hatására, ez a SIPK (salycilc-acid-induced protein kinase; MIKOLAJCZYK et al. 2000). Továbbá, egy *Arabidopsis* fehérje, amely keresztreakciót mutat a dohány MAPK antitesttel, szintén aktiválódik ozmotikus stressz hatására (HOYOS et al. 2000). Izoláltak egy, a lucerna SIMK-t aktiváló MAPK-kinázt (KIEGERL et al. 2000), és egy, a dohány SIPK-val kölcsönható MAPKK-t is (LIU et al. 2000). A MAP kináz kaszkádok tehát a növényi stressz-szignál átvitelben is részt vesznek. Szerepük pontosabb feltérképezéséhez azonban további, elsősorban funkcionális analízis szükséges, különös tekintettel a kaszkádok „outputjának" mibenlétére.

2.3.2.2. Kalcium és kalcium szabályozott fehérjék

Bár a sokféle szignál transzdukciós folyamat nagyon sok ponton kapcsolódik egymáshoz, nincs még egy olyan sokféle környezeti „input" közvetítésében résztvevő szignál komponens, mint a kalcium. Ilyen például a vörös fény, abszcizinsav, gibberellin, ozmotikus stressz, hideg, meleg, érintés, gomba elicitorok, oxidatív stressz, NOD faktorok (SANDERS et al. 1999). A sejtek citoplazmás szabad Ca^{2+} koncentrációja ($[Ca^{2+}]_c$) alapállapotban jóval millimoláris koncentráció alatt van, ami azonban a környezeti hatásokat követően gyorsan megemelkedik. A kialakuló választ feltehetőleg együtt befolyásolja az emelkedés kinetikája, mértéke és a Ca^{2+} sejtbeli forrása (KNIGHT et al. 2001). A $[Ca^{2+}]_c$ változásai Ca^{2+}-regulált fehérjéken keresztül fejtik ki hatásukat. Ezek

legfontosabb csoportjai a kalmodulinok, kalcium-függő protein-kinázok (CDPK-k) és kalcium-regulált foszfatázok.

A különböző jelátviteli utak közötti specificitás szétválasztásában szerepet kaphatnak e fehérjék különböző izoformái (HEO et al. 1999, SHEEN 1996) is. Az *Arabidopsis* genomban több mint 40 CDPK gén található, ami bőséges teret biztosít a specifikus feladatok elkülönítésére (HARMON et al. 2000). A $[Ca^{2+}]_c$ a szerin/treonin-foszfatázokra (PPázok) szintén hat. Egyikük, az SOS3 só stressz specifikus, és a nagyon jól feltérképezett SOS (Salt Overly Sensitive) útvonalban vesz részt (ZHU 2001). Természetesen a specifikus folyamatokon túl, az a tény, hogy a $[Ca^{2+}]_c$ nagyon sok környezeti hatás következtében megemelkedik, valószínűsíti azt, hogy ez az egyik olyan pont, ahol a különböző szignál utak csatlakozhatnak (KNIGHT et al. 2001).

2.3.2.3. Abszcizinsav

A sok növényélettani folyamat szabályozásában résztvevő növényi hormon, az abszcizinsav (ABA), szerepe már több évtizede intenzív kutatás tárgya (összefoglaló: SEO et al. 2002, HETHERINGTON 2001; SHINOZAKI et al. 2000, GRILL et al. 1998; LEUNG et al. 1998; BONETTA et al. 1998). Az ABA-nak döntő szerepe van a késői magfejlődés szabályozásában, valamint a környezeti stresszekre (vízhiány, só, hideg) adott növényi válaszok kialakulásában. Az ABA koncentráció az embriófejlődés késői stádiumában, nem sokkal a mag kiszáradása és a dormancia kezdete előtt megemelkedik. A csírázás

folyamatában a gibberellinsav antagonistájaként működik. ABA-deficiens mutánsokat korai csírázású mutánsok izolálásakor találtak először. ABA-antitestet termelő transzgénikus dohánynövények gyakorlatilag szabad ABA mentesek és magjaik fejlődési rendellenességeket mutatnak (PHILLIPS et al. 1997).

Emellett vegetatív szövetekben az ABA bioszintézise vízhiány következtében is megindul. A szárazság stressznek kitett levelek ABA koncentrációja magas szintet mutat. Ennek az összefüggésnek a felismerése sugallta először, hogy az ABA stressz-válasz közvetítő hormon. Valóban, a legtöbb ABA-deficiens mutáns vízháztartása sérült, sztómazáródásuk szabályozása rendellenes, vízvisszatartó képességük csökkenése következtében hervadásos tüneteket mutatnak. A gyökerekben termelt ABA feltehetőleg hosszú távú szignálként hat. A talaj kiszáradásának megindulásával a levelekbe jutva kiváltja a sztómák záródását, így a növény a csökkenő vízforrás mellett csökkent mértékben folytatja a párologtatást is. A szárazság-tolerancia mechanizmusaihoz szorosan kapcsolódó módon az ABA részt vesz a só és a hideg válasz közvetítésében is, valamint a sebzés és a hő stressz jelátvitelében is. A *C. plantagineum* deszikkáció toleranciájának kialakításában is fontos szerepe van az ABA-nak. *C. plantagineum* kalluszkultúrák 4 napos ABA előkezelést követően képesek túlélni a kiszáradást, míg ABA nélkül nem (BARTELS et al. 1990).

Az ABA indukált szignál transzdukció elemei közül intenzív kutatások ellenére is csak viszonylag keveset ismerünk. Feltehetőleg az

ABA-nak létezik mind plazmamembrán, mind pedig belső receptora, ezeket azonban még nem sikerült izolálni (HETHERINGTON 1999). Az ABA inszenzitív mutánsok (*abi*) izolálása, jellemzése és klónozása mind pozitív, mind negatív szabályozó elemek azonosítását eredményezte. Közülük az *abi3-5* gének transzkripciós faktorokat kódolnak.

A magasabb szintű szabályozásban a fehérje foszforiláció és defoszforiláció minden bizonnyal jelentős szereppel bír. Erre közvetett bizonyítékot eleinte széles spektrumú protein-kináz gátlók (pl. K-252a) használata nyújtott, mivel így gátolható az ABA-indukált sztómazáródás és génexpresszió (HEY et al. 1997, SCHMIDT et al. 1995, WU et al. 1997). Ugyanakkor kináz gátlók alkalmazásával demonstrálták azt is, hogy protein-kinázok negatív regulátorként is működnek (PEI et al. 1997). Később sikerült is több, az ABA hatásában közreműködő protein-kinázt azonosítani. Ilyen például egy zárósejt-specifikus fehérje-kináz (AAPK), amelynek működése nélkülözhetetlen az ABA-indukált sztómazáródáshoz (LI et al. 2000), vagy a PKABA1-kináz, amely részt vesz az ABA-függö génexpresszió szabályozásában (GOMEZ-CADENAS et al. 1999).

Az ABA jelátvitelében szerin/treonin protein-foszfatázok is részt vesznek. Az okadainsav egyes csoportjaik inhibitoraként hat. Okadainsav kezeléssel a növényi ABA-választ csökkenteni és fokozni is lehetett (SCHMIDT et al. 1995, HEY et al. 1997, PEI et al. 1997, KUO et al. 1996), vagyis ezek a foszfatázok pozitív és negatív regulátorként egyaránt részt vesznek az ABA hatásának kifejtésében.

Az *abi1* és *abi2* mutánsok analízise tárta fel a PP2C-típusú foszfatázok szerepét az ABA jelátvitelében. Ez a két *Arabidopsis*-ból izolált ABA-inszenzitív mutáns (KOORNNEEF et al. 1984) pleiotróp fenotipikus változásokat okozott. Ilyen volt például az ABA-rezisztens csírázás és hajtásnövekedés, valamint a gázcserenyílások abnormális működése. Az *abi1-1* és *abi2-1* mutánsok további intenzív vizsgálata során kiderült, hogy a mutációk két homológ *PP2C* gént érintettek. Funkciójuk meghatározását azonban nehezítette az a tény, hogy ezek domináns mutánsok voltak (MEYER et al. 1994, LEUNG et al. 1994 LEUNG et al. 1997, RODRIGUEZ et al. 1998). A később izolált recesszív *abi1* mutánsok viszont nem ABA-rezisztensek, hanem éppen ellenkezőleg ABA-hiperszenzitívek voltak, csakúgy, mint a recesszív *abi1* és recesszív *abi2* dupla mutánsok. Továbbá az ABI1 és ABI2 foszfatázok aktivitása ABA hatására fokozódik (GOSTI et al. 1999, MERLOT et al. 2001). E mutánsok analízisének eredménye az a modell, miszerint részben átfedő funkcióval, az ABI1 és ABI2 foszfatázok az ABA válasz negatív regulátorai, egy negatív visszacsatolási hurokban.

Élesztőben csak 5 PP2C található, ezzel szemben az *Arabidopsis* genomban harmincnál is több PP2C-szerű gén van. A recesszív *abi1* és *abi2* dupla mutánsok vizsgálata azt mutatta, hogy az ABA-indukált foszfatáz aktivitásnak csak mintegy 50%-a tulajdonítható e két enzimnek (MERLOT et al. 2001). Valószinű tehát, hogy az ABA-indukált szignál transzdukcióban más PP2C foszfatázok is részt vesznek.

2.3.3. *A vízhiány-indukált gének promoterei és transzkripciós faktorai*

A vízhiány érzékelésével aktiválódott szignál transzdukciós mechanizmusok egy sor gén expresszióját megváltoztatják. A vízhiány-indukált gének közül sok promoterét izolálták, és riporter génekkel igazolták azok stressz-indukálhatóságát. A promoter szekvenciákban a transzkripciós faktor fehérjék kötődését ún. *cisz*-elemek biztosítják, amelyek rövid (általában <10 nukleotid), de nagyon konzervatív DNS szekvenciák. Ezek közül, és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék közül is, viszonylag sokat izoláltak és jellemeztek már.

2.3.3.1. b-ZIP fehérjék

A bázikus leucin cipzár (basic leucine zipper, b-ZIP) fehérjék egy bázikus aminosavakban gazdag DNS kötő domént, és egy vele szomszédos leucin cipzár fehérje dimerizációs domént tartalmaznak. Az ABRE (ABA-responsive element) típusú *cisz*-elemeket kötő b-ZIP faktorok bizonyára fontos szerepet játszanak az ABA-indukált génexpresszióban. Ilyen például a búza EmBP1 (GUILTINAN et al. 1990), a dohány TAF-1 (OEDA et al. 1991), a rizs OSBZ8 (NAKAGAWA et al. 1996) és OsZIP-1a (NANTEL et al. 1996). UNO et al. (2000) *Arabidopsis*-ból izoláltak két ABRE-kötő b-ZIP fehérjét kódoló cDNS-t (AREB1-2), amelyek transzkripcionálisan aktiválódnak vízhiány, só és ABA hatására. Mindkét fehérje képes ABRE által szabályozott riporter gént ABA hatására indukálni. Az *abi5* ABA-inszenzitív

mutációért felelős gén is AREB-szerű fehérjét kódol (FINKELSTEIN et al. 2000). Ezektől függetlenül izolálták az ABF (ABA-responsive element binding factor) család tagjait *Arabidopsis*-ból, amelyek szintén részt vesznek az ozmotikus stressz jelátvitelében (CHOI et al. 2000).

2.3.3.2. Myb és Myc fehérjék

A Myb fehérjék egy általánosan elterjedt konzervált transzkripciós faktor család. Növényekben is nagyon sok Myb fehérje található a funkciók széles skálájával. A Myb motívum három szakasz nem tökéletes ismétlődéséből áll, amelyek egy helix-turn-helix-szerű motívumot hoznak létre. Minden ismétlődő szakaszban 18-19 aminosavanként három triptofán található, ezek alakítják ki a funkcionális Myb domén másodlagos szerkezetét (MEISSNER et al. 1999). A vízhiány-indukált *Arabidopsis Atmyb-2* az ABA- és vízhiány-indukálható *rd22* gén expressziójának pozitív szabályozója (ABE et al. 1997). *Myb*-szerű géneket *Craterostigma*-ból is klónoztak: a gyökér-specifikus *cpm7* vizhiány-, míg a *cpm10* ABA-indukálható (ITURRIGA et al. 1996).

A Myc fehérjék bHLH (basic helix-loop-helix) domént tartalmaznak, ami két szubdoménből áll: egy, a b-ZIP-ekben találhatóhoz hasonló bázikus régió, amely a DNS kötésért felelős, és egy, a dimerizációért felelős helix-loop-helix (HLH) domén. A vízhiány-, só- és ABA-indukálható *Arabidopsis rd22BP1* gén, amely egy Myc homológ transzkripciós faktort kódol, szintén részt vesz az *rd22* gén aktiválásában

(ABE et al. 1997). Az *rd22BP1* expressziója megelőzi az *rd22* génét, ami alátámasztja működésük hierarchiáját.

2.3.3.3. AP2/EREBP domén

Arabidopsis vízhiány- és hideg-indukálható gének vizsgálata vezetett az ún. C-repeat motívum (CCGAC) felfedezéséhez. Ugyanez a motívum megtalálható a DRE (dehydration-responsive) *cisz*-elemben is, amit a vízhiány- és hideg-indukálható *rd29A* gén promoterében írták le először (YAMAGUCHI-SHINOZAKI et al. 1993). Később két, ehhez specifikusan kapcsolódó fehérje faktort (DREB1A, DREB2A) is izoláltak (LIU et al. 1998). A C-repeat hideg-indukálható gének promoter régióiban is előfordul. STOCKINGER et al. (1997) izoláltak egy cDNS klónt (CBF-1), amely egy C-repeat/DRE-kötő faktort kódol. A DREB és CBF fehérjék AP2/EREBP domént tartalmaznak, ami a transzkripciós aktivátor faktorok jellemzője. Funkciójuk alapján a DREB faktorok két családra oszthatóak: a DREB1/CBF faktorok a hideg, míg a DREB2 faktorok a vízhiány szignál-transzdukciójában vesznek részt (SHINOZAKI et al. 2000). SEKI et al. (2001) cDNS microarray analízissel 12 stressz-indukálható potenciális DREB1A célgént azonosított. Közülük 6 korábban ismeretlen volt.

DREB1A/CBF kifejeztetése transzgénikus növényekben növelte azok fagy, vízhiány és só toleranciáját, miközben megemelte a DREB1A célgének expresszióját (LIU et al. 1998, KASUGA et al. 1999). A *35S* promoter által kifejeztetett DREB1A azonban stressz mentes

körülmények között a kontroll növényeknél komoly fejlődési hátrányt okozott. A stressz-indukálható *rd29A* promoter használata minimalizálni tudta ezt a káros hatást. Sőt, az *rd29A* promoter használata nagyobb mértékű toleranciát biztosított a vízhiány, só és fagyás károsító hatásaival szemben, mint a *35S* promoteré. Az *rd29A*::*DREB1A* rendszer egy öngerjesztő rendszer, ami stressz hatására expresszálja a DREB1A fehérjét, és ez végül is a célgének nagyobb mértékű expresszióját okozza. Ez a rendszer egy nagyon elegáns példa arra, hogy stressz-specifikus szabályozó elemek felhasználása milyen potenciális lehetőségeket hordoz a stressz tolerancia biotechnológiai fokozására.

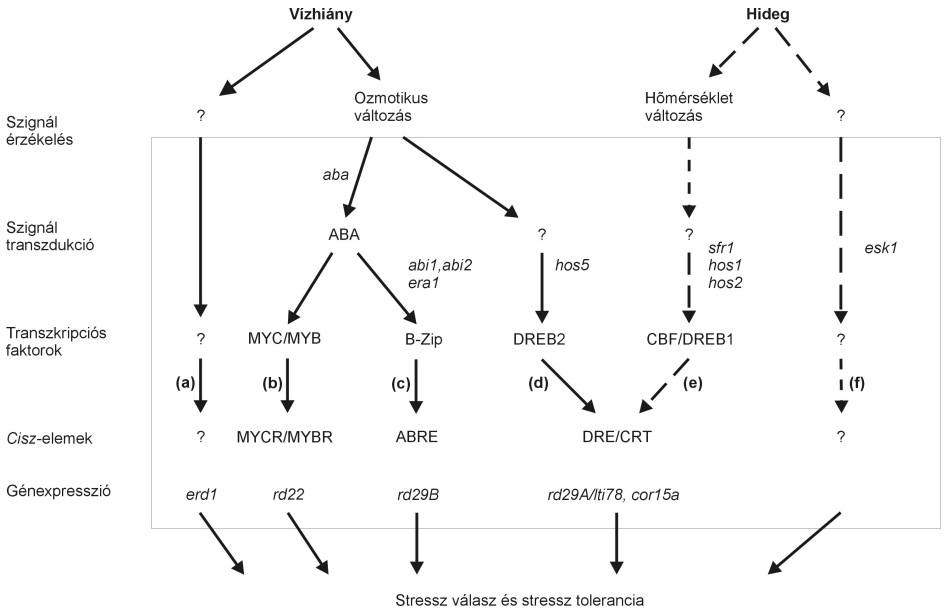
2.3.3.4. HD-ZIP fehérjék

Homeodomén–leucin cipzár (homeodomain-leucine zipper, HD-ZIP) géneket eddig csak növényekben azonosítottak. Az általuk kódolt fehérjék fejlődési és környezeti válaszok szabályozásában vesznek részt. A HD-ZIP fehérjékben egy DNS-kötő homeodomén mellett egy leucin cipzár motívum található. A stressz-indukálható *HD-ZIP* gének bizonyára szerepet játszanak a stressz-gének expressziójának szabályozásában, bár ilyen HD-ZIP fehérjék által szabályozott célgéneket eddig nem sikerült azonosítani. *Craterostigma*-ból két, kéthibridrendszerben kölcsönható HD-ZIP fehérje génjét izolálták (*CPHB-1*, *CPHB-2*; FRANK et al. 1998). Mindkét gén indukálható volt vízhiány által, ABA kezelésre azonban csak a CPHB-2 transzkriptum szint emelkedése indult meg. Lehetséges tehát, hogy a két fehérje ABA-függő és ABA-független jelátviteli utak

kapcsolódási pontján működik. *Arabidopsis*-ban három vízhiány-indukálható HD-ZIP gént azonosítottak: *ATHB-7* (SÖDERMAN et al. 1996), *ATHB-6* (SÖDERMAN et al. 1999) és *ATHB-12* (LEE et al. 1998). Mindhárom gén ABA-függő módon reagált a vízhiányra, és az *ATHB-7* nem volt indukálható ABA bioszintézis mutáns növényben.

2.3.4. *A szignál transzdukciós utak hálózata*

A sokféle környezeti hatás által kiváltott adaptációs folyamatokat a génexpressziós mintázat „átprogramozása” biztosítja. Ezt a folyamatot számos szignál transzdukciós mechanizmus irányítja. A stressz- és hormon-indukálható gének vizsgálata során azonban kiderült, hogy különböző környezeti stimulusok gyakran ugyanazokat a géneket indukálják. A szignál transzdukciós folyamatok elemeinek vizsgálata pedig azt mutatta, hogy ugyanazok az elemek többféle környezeti hatás közvetítésében is részt vehetnek. Mindebből az következik, hogy ezek az útvonalak nem különálló egységek, hanem inkább egy bonyolult jelátviteli hálózat részei, amelyben a specificitás inkább kivétel, mint szabály. Így lehetővé válik az adaptív válaszok finomhangolása, illetve a sokféle lehetséges külső hatás jelátvitele is viszonylag csekély számú átvivő elem kombinációjával biztosítható. Természetesen az átfedéseket az is magyarázza, hogy a különböző stresszhatások gyakran azonos gének működésbe lépését teszik szükségessé.



1. ábra. A kezdeti vízhiány, illetve hideg stressz-szignál és a génexpressziós változások közötti szignál transzdukciós mechanizmusok *Arabidopsis*-ban. Folyamatos nyilak a vízhiány, szaggatott nyilak a hideg szignál transzdukciójában résztvevő mechanizmusokat jelölik. (Átvéve: Shinozaki et al. 2000)

A stressz-regulált szignál transzdukciós útvonalak közötti kapcsolatok, az ún. „cross-talk” intenzív vizsgálati területté vált az utóbbi időben (összefoglaló: FINKELSTEIN et al. 2002, KNIGHT et al. 2001, GAZZARRINI et al. 2001, ZHU 2001, SHINOZAKI et al. 2000, JENKINS 1998, SHINOZAKI et al. 1997).

A vízhiány jelátvitele kapcsolatban van többek között a hőstressz, az anaerbiózis, az oxidatív stressz, a sebzés, az etilén vagy a cukor jelátviteli folyamataival, de különösen sok figyelmet kaptak a vízhiány, a sóstressz és a hidegstressz szignál transzdukciós mechanizmusainak összefüggései. Ezek szerint legalább hat szignál transzdukciós útvonal létezik a kezdeti vízhiány vagy hidegstressz szignál és a génexpresszió változásai között (1. ábra). A vízhiány által indukált gének többsége indukálható ABA-kezelés vagy hideg hatására is, és az ilyen típusú jelátviteli mechanizmusok elemei meglehetősen jól ismertek. Sem *cisz*-elemet, sem más, magasabb szintű szabályozó elemet nem sikerült azonban azonosítani azon az útvonalon, ami az *erd1* gént indukálja *Arabidopsis*-ban, és amelyik független mind az ABA-, mind a hideg-indukálható gének szabályozási mechanizmusaitól.

2.4. Az *ASR* gének és a *DS2*

A vízhiány által indukált gének jó része ABA kezelés hatására, vagy a termésérés során is indukálódik. Ilyen a paradicsomból izolált *ASR1* (*A*BA-, *s*tress- and *r*ipening-induced) gén is (IUSEM et al. 1993). Később kiderült, hogy az *ASR1* egy kisebb géncsalád tagja (*ASR1-ASR4*; AMITAI-ZEIGERSON et al. 1994, GILAD et al. 1997). Az *ASR* génekhez homológ gének széles körben elterjedtek a növényvilágban. Ilyen géneket izoláltak fenyőből (CHANG et al. 1995), óriáscitromból

(CANEL et al. 1995), kajszibarackból (MBEGUIE-A-MBEGUIE et al. 1997), körtéből (ITAI et al. 2000) és liliomból (HUANG et al. 2000) is. Bár elterjedésük nagyon általánosnak tűnik, az *Arabidopsis* genomban nem található *ASR*-homológ szekvencia. A fenyőből izolált *lp3* gén, hasonlóan a paradicsom génekhez, szintén egy kisebb géncsaládhoz tartozik, amelynek eddig 4 tagját ismerjük (PADMANABHAN et al. 1997). Különleges tagja a géncsoportnak a burgonyagumóban hideg tárolás során akkumulálódó *ci21* (VAN BERKEL et al. 1994), amelynek két szorosan kapcsolt génje van: *CI21A* és *CI21B* (SCHNEIDER et al. 1997).

Szintén *ASR* homológ a *S. chacoense* vad burgonya fajból csoportunk által korábban izolált DS2 cDNS (SILHAVY et al. 1995). A *DS2*, hasonlóan az *ASR* génekhez, vízhiány következtében erősen indukálódik, viszont azokkal ellentétben nem ABA-indukálható.

A jól konzerváltan *ASR* homológ szekvenciában a 29. és a 147. aminosavak között a DS2-ben egy inzert található, amely az erősen hidrofil GDDNK/TYGEKTSYG konszenzus szekvencia 10, nem tökéletes ismétlődéséből áll. A kajszibarack cDNS szintén hordoz egy ismétlődő mintázatú inzertet *ASR* homológ részei között. A fenyő *lp3*-ban és a liliom *LLA23*-ban is van egy-egy kisebb inzert, ezek azonban nem ismétlődő szerkezetűek. A különböző inzert szekvenciák nem homológok egymással, de közös tulajdonságuk hidrofil jellegük. Az *ASR* homológ gének funkciója nem ismert, aminosav szekvenciájuk alapján valószínűleg α-hélix struktúrákat alakítanak ki, és a fehérjetermék a

sejtmagban lokalizálódik (GILAD et al. 1997). A *DS2* C-terminálisán található egy sejtmag lokalizációs szignál, ami valószínűsíti, hogy ez a fehérjetermék is a nukleuszban akkumulálódik.

A DS2 N-terminálisába inzertálódott ismétlődő szerkezetű szekvencia szakasz valószínűleg ún. „random coil” szerkezetet alakít ki. Ez a szerkezet a LEA fehérjék 1. csoportjára jellemző. Ezeknek a hidrofil LEA fehérjéknek feladata feltehetőleg a citoplazma makromolekuláris struktúráinak a védelme a kiszáradástól. A szerkezeti hasonlóság és a sejtmag lokalizációs szignál alapján SILHAVY et al. (1995) szerint a DS2 fehérje hasonló funkciót láthat el a sejtmagban.

Mindezek alapján munkánk célja kettős volt:

[1]: A *DS2* vízhiányban betöltött szerepének igazolása a *DS2* konstitív kifejeztetésével, illetve antiszensz gátlásával transzgénikus burgonya növényekben.

[2]: A *DS2* szabályozásának vizsgálata, egyrészt a gén különböző - az ozmotikus stresszel kapcsolatba hozható - stresszhatások általi indukálhatóságának vizsgálatával, másrészt a *DS2* gén promoterének izolálásával és jellemzésével.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Vegyszerek

Kísérleteinkhez a Reanal, Sigma, Serva és Fluka cégek által gyártott vegyszereket és az MBI Fermentas, Appligene Oncor és Promega által gyártott enzimeket használtuk.

3.2. Plazmidok

A munkánk során használt kiindulási klónozó vektorokat és plazmidokat az 1. táblázatban foglaltuk össze. Az ezek alapján elkészített, és kísérleteinkhez felhasznált plazmid klónokat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

3.3. Táptalajok

Az *Escherichia coli* bakteriális és fág munkákhoz LB, NZY és NZY top, *Agrobacterium tumefaciens* munkákhoz LB és YEB táptalajokat (SAMBROOK et al. 1989) használtunk, amelyeket a megfelelő antibiotikumokkal egészítettünk ki.

1. táblázat.

Vektorok és plazmidok

A vektor/plazmid neve	**forrása**	**típusa**
λ DASH II	Stratagene, La Jolla, USA	λ fág „replacement” vektor
pBluescript II KS	Stratagene, La Jolla, USA	*E. coli* klónozó vektor
pGEM7	Promega, Madison, USA	*E. coli* klónozó vektor
pDS2	SILHAVY et al. 1995	cDNS klón
pDV437	DALLMAN G (MBK, Gödöllő), nem közölt vektor	*GUS*::*Nos*T fúziós konstrukció, pBluescript II KS vektorban
pCP60	RATET, P (CNRS Institut des Sciences Vegetales, Gif-sur-Yvette, Franciaország), nem közölt vektor	bináris növény-transzformációs vektor
pGA/35N	PALKOVICS et al. 1995	bináris növény-transzformációs vektor

2. táblázat.

A munkánk során létrehozott plazmid klónok

A plazmid klón neve	**vektor**	**inzert**
sDS2 (szensz DS2)	pGA/35N	DS2G, *Kpn*I-*Xba*I
aDS2 (antiszenszDS2)	pGA/35N	DS2 cDNS, fordított orientációban, *Kpn*I-*Xba*I
DS2G	pBluescript II KS	DS2-vel hibridizáló burgonya genomi DNS, *Eco*RI-*Hin*dIII
DS2H	pBluescript II KS	DS2-vel hibridizáló burgonya genomi DNS, *Hin*dIII
DS2J	pBluescript II KS	DS2-vel hibridizáló burgonya genomi DNS, *Eco*RI-*Pvu*II
CP/GUS	pCP60	*GUS*::*NosT*, *Bam*HI-*Not*I
GGUS	pCP/GUS	234 bp *DS2* promoter, *Xba*I-*Sma*I
HGUS	pCP/GUS	498 bp *DS2* promoter, *Hin*dIII-*Sma*I
JGUS	pCP/GUS	1140 bp *DS2* promoter, *Hin*dIII-*Bam*HI

3.4. Baktériumtörzsek

A klónozási munkákhoz az *E. coli* DH5α (HANAHAN 1983) vagy JM109 törzseket (YANISCH-PERRON et al. 1985) használtuk. A Lambda DASH II vektorban létrehozott genomi klóntár amplifikálásához

és vizsgálatához a gyártó Stratagene cég által forgalmazott *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) gazdatörzset alkalmaztuk.

Növény-transzformációhoz és tranziens expressziós esszéhez pGV2260-t hordozó *A. tumefaciens* C58C1 törzset (DEBLAERE et al. 1985) használtunk.

3.5. Növények

A kísérleteink során felhasznált növényfajokat és fajtákat a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat.

Növényfajok és fajták

Növényfaj	**Fajta**
Solanum tuberosum	cv. Désirée
	cv. White Lady
Solanum brevidens	
Lycopersicum esculentum	cv. K252
	cv. Korall
	sitiens (ABA bioszintézis mutáns vonal)
Nicotiana benthamiana	

3.6. A növények nevelése és fenntartása

A kísérletekhez használt növényeket cserepekben Florasca B típusú virágföldben, üvegházban vagy fitotronban tartottuk. Az üvegházban tartott növényeknél téli időszakban két órás mesterséges pótmegvilágítást alkalmaztunk. A fitotronban tartott növényeknél 16/8 h fény/sötét fotoperiódust, 99-100% relatív páratartalmat és 24°C hőmérsékletet állítottunk be. *In vitro* növényanyagokat szárszegmensekről vegetatív módon szaporítottunk MS táptalajon (MURASHIGE et al. 1962), 16/8 h fény/sötét fotoperiódus és 24°C hőmérséklet mellett.

3.7. A növények kezelései

A kezelések során mindig a növények felülről második-harmadik levélszintjéről vettünk külsőleg egészséges, feszes turgorú, leveleket. Szárazság stresszt kétféle módon idézünk elő: vagy levett levelet szárítottunk 30% tömegvesztésig, vagy egész cserepes növénytől megvontuk az öntözést 7-10 napig. Kémiai anyagokkal történő kezelés esetén a levélnyelet alámerítve, levett leveleket állítottunk a megfelelő oldatokba: 20%-os PEG oldatban 24 óráig, 200 mM NaCl oldatban 4 és 8 óráig, 200 μM ABA oldatban 24 óráig és 300 μM cikloheximid oldatban 8 óráig. Oxidatív stressz kiváltásához PERL-TREVES et al. (1991) szerint üvegházi cserepes növényeket permeteztünk paraquat oldattal (kb.

15 ml/növény), majd 90 perc és 4 óra után vettünk mintákat. Hipoxikus stresszhez a cserepeket 4-5 cm-rel víz alá merítettük 6 vagy 12 óráig. Hőmérsékleti stresszeket fitotronban idéztünk elő 42°C-on 3 és 6 óráig (hőstressz), vagy 4°C-on 48 óráig (hideg stressz).

Kontrollként minden esetben az adott növényről származó egy-egy levelet azonnal lefagyasztottunk folyékony nitrogénben, illetve a kémiai kezelések mellett párhuzamosan desztillált vízbe állítottunk.

3.8. Molekuláris biológiai módszerek

3.8.1. *Növényi DNS tisztítása*

Növénymintáinkból DNS-t SHURE et al. (1983) módszerének nyomán vontunk ki. Körülbelül 0,2 g mintát 2 ml-es Eppendorf csőben, folyékony nitrogénben elporítottunk, kivonó puffer (0,6 M NaCl, 0,1 M Tris pH 7,5, 40 mM EDTA, 4% Sarcosyl, 1% SDS) : 10 M urea 1:1 arányú keverékével, majd kétszer 1:1 arányú fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, és izopropanollal (végkoncentráció: 40%) kicsaptuk. A csapadékot visszaoldottuk (általában 200 μl TE, azaz 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 pufferben) majd 20 μg RN-áz A-val kezeltük (37°C, 1 h) és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.8.2. *Növényi RNS tisztítása*

Növénymintáinkból össz-RNS-t STIEKEMA et al. (1988) módszerének nyomán vontunk ki. Körülbelül 0,2 g mintát dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben elporítottunk, kivonó puffer (0,2 M Na-acetát pH 5,2, 1% SDS, 10 mM EDTA) : fenol 1:1 arányú keverékével, majd kétszer 1:1 arányú fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, és LiCl-dal (végkoncentráció: 2,5 M) kicsaptuk. A csapadékot 75%-os etanolban kétszer mostuk, visszaoldottuk (általában 20 μl steril desztillált vízben) és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.8.3. *Plazmid DNS tisztítása*

Bakteriális plazmid DNS-t az ún. alkalikus lízis módszerrel tisztítottunk (SAMBROOK et al. 1989). Amennyiben DNS szekvencia meghatározása volt a cél, a DNS oldatból 20 μg RN-áz A enzimmel degradáltuk az RNS-t (37°C, 30 perc), majd a DNS-t 13%-os PEG 6000, 10 mM $MgCl_2$ oldattal kicsaptuk, 75%-os etanolban kétszer mostuk, szárítottuk és 20-50 µl desztillált vízben oldottuk vissza.

3.8.4. *Emésztés restrikciós endonukleáz enzimekkel*

Plazmid DNS-eket 10-20 µl reakció-térfogatban, a gyártó által javasolt pufferben és hőmérsékleten 15-60 percig emésztettük. A növényi DNS mintákat szintén a megadott optimális pufferben és hőmérsékleten, 200 µl reakció-térfogatban, 100-150 U enzimmel egy éjszakán át inkubáltuk.

3.8.5. *Polimeráz láncreakció* (PCR – Polymerase Chain Reaction)

PCR reakciókat 50 µl végtérfogatban kb. 100 ng DNS templátot, 1,5 mM $MgCl_2$-ot, 30-50 pmol primert, 0,4 mM dNTP keveréket, megfelelő puffert és 1 U Taq polimeráz enzimet tartalmazó eleggyel végeztünk. A reakcióelegyet első lépésben denaturáltuk (5 perc, 94°C), majd 30-35 cikluson át 94°C-on 30 s-ig, a megfelelő anellálási hőmérsékleten 30 s-ig és 72°C-on 1 percig inkubáltuk, végül a keletkezett terméket egyszer 10 percig 72°C-on elongáltuk.

3.8.6. *DNS fragmentumok elválasztása és izolálása*

A restrikciós emésztés és a PCR során keletkező DNS fragmentumokat 1 vagy 2%-os agaróz gélben választottuk el 1 mg/l etídium-bromidot tartalmazó TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM bórsav, 20 mM EDTA) pufferben és UV fényben tettük láthatóvá. A kívánt DNS fragmentumokat

az agaróz gélből szikével kivágtuk és a gyártó utasításait követve, QIAEX II Gel Extraction Kittel (QIAGEN) izoláltuk.

3.8.7. *DNS klónozás*

Izolált DNS fragmentumokat a megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztett plazmid vektorokba építettük. Kivételes esetekben, amikor a kívánt konstrukció létrehozásához nem állt rendelkezésre megfelelő restrikciós hely (mint pl. a 4.2. fejezetben leírt egyes növényi transzformációs vektor konstrukcióknál) ragadós végű hasítási helyre tompa végű fragmentumot klónoztunk. Ilyenkor a vektor DNS-t restrikciós emésztés után feltöltöttük: az izolált vektor DNS-hez 200 nM dNTP keverék jelenlétében 2,5 U Klenow enzimet adtunk a megfelelő pufferrel, majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk.

A ligálási reakciókba 10 µl végtérfogatban kb. 100 ng fragmentumot, tízszeres moláris többletben vektort, 1 U T4 ligáz enzimet és a gyártó által mellékelt puffert vittünk. Ezt egy éjszakán keresztül 16°C-on vagy 4°C-on inkubáltuk.

3.8.8. *Plazmid DNS bejuttatása baktérium sejtekbe*

Az *E. coli* sejtek transzformálását INOUE et al. (1990) módszere szerint végeztük. A kompetens sejt szuszpenziót 100 vagy 200 µl-enként folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és –70°C-on tároltuk a felhasználásig. Transzformáció után a sejteket antibiotikum-mentes folyékony tápoldatban 37°C-on rázattuk, majd a szelekciós markernek megfelelő antibiotikummal kiegészített szilárd táptalajra szélesztettük. Amennyiben a vektor konstrukció a kék-fehér szelekciót lehetővé tette, a szilárd táptalajra ezt megelőzően 10 µl 1 M izopropil-tio-β-D-galaktozidot (IPTG) és 40µl 20 mg/ml 5-brormo-4-kloro-3-indolil--β-D-galaktozid-ot (X-gal) szélesztettünk.

Növény-transzformációs vektor plazmidokat *E. coli* sejtekből *A. tumefaciens* sejtekbe pRK2013 „helper” plazmid (FIGURSKI et al. 1979) segítségével háromszülős keresztezéssel juttatunk át DITTA et al. (1980) módszere szerint. A „donor”, „recipiens” és „helper” törzseket szilárd táptalajról antibiotikum-mentes szilárd táptalajra oltottuk úgy, hogy a három oltási csík egy pontban metssze egymást, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk. Miután a kolóniák kinőttek, a metszési pontból átoltottunk a megfelelő két antibiotikummal kiegészített szilárd táptalajra, és szelektáltunk a vektort hordozó *A. tumefaciens* sejtekre.

3.8.9. *DNS fragmentumok nukleotidsorrendjének meghatározása és analízise*

A DNS klónok egy részének nukleotidsorrendjét SANGER et al. (1977) dideoxy láncterminációs eljárását alkalmazva, USB Sequenase Version 2.0. kittel határoztuk meg. A reakciótermékeket 6%-os poliakrilamid gélen TBE pufferben választottuk el, majd a gélt üveglapra szárítottuk és röntgen filmre exponáltuk. Bizonyos klónok esetében igénybe vettük az MTA Szegedi Biológiai Központ DNS Szekvenáló Laboratórium szolgáltatását. A DNS szekvenciák analízisét a Genetics Computer Group (Wisconsin, USA) programcsomagjával, valamint a FASTA (PEARSON et al. 1988) és BLAST (ALTSCHUL et al. 1997) programokkal végeztük. Promoter szekvencia analízishez ezen kívül a Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements (PLACE; HIGO et al. 1999) és a PlantCARE (ROMBAUTS et al. 1999) adatbázisok programjait is használtuk.

3.8.10. *Hibridizációs technikák*

3.8.10.1 Southern hibridizáció

A növényi DNS mintákból 10-10 μg-ot emésztettünk, majd 0,8%-os agaróz gélben, alacsony feszültség mellett, egy éjszakán keresztül elválasztottuk, utána 0,25 M HCl-ban rázattuk 10 percig, majd kétszer 15 percig 0,4 M NaOH-ban rázatva neutralizáltuk. A DNS-t 0,4 M NaOH

oldattal Hybond N+ (Amersham) membránra blottoltuk (SAMBROOK et al. 1989) és egyben fixáltuk is.

3.8.10.2. Northern hibridizáció

A növényi RNS mintákból LOGEMANN et al. (1987) módszerével 20-20 μg-ot denaturáltunk és formaldehid tartalmú 1%-os agaróz gélben elválasztottunk. A gélt 20 percig 20xSSC-ben (3M NaCl, 3,3 mM tri-Na-citrát, pH 7,0) mostuk, majd 10xSSC-vel blottoltuk Hybond N vagy N+ membránra, végül UV cross-linker készülékkel fixáltuk.

3.8.10.3. Plakk hibridizáció

A burgonya White Lady genomi klóntár vizsgálatához a megfelelő mennyiségű fágot a gazdatörzzsel együtt NZY top táptalajban NZY táptalajra szélesztettük (SAMBROOK et al. 1989). A plakkok megjelenése után azokra Hybond N+ membránt helyeztünk, majd a megtapadt plakkokat feltártuk (7 perc, 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl), neutralizáltuk (2×5 perc, 0,5 M Tris pH 7,5, 1,5 M NaCl), végül UV cross-linker készülékkel fixáltuk.

3.8.10.4. DNS jelölése radioaktív izotóppal

A Southern és northern hibridizációkhoz α-^{32}P-dCTP-vel jelölt, tisztított DNS fragmentumokat használtunk. A jelölést „random priming” módszerrel végeztük (FEINBERG et al. 1983).

3.8.10.5. Hibridizációs körülmények

A különböző blottolási technikákkal készült membránokat azonos módon hibridizáltuk. A jelölt próbát a CHURCH et al. (1984) által leírt pufferben (0,5 M Na_2HPO_4, 7% SDS, 1mM EDTA, 1% BSA, pH 7,2), forgó hibridizációs tégelyben, 65°C-on, 20 órán át inkubáltuk a membránnal. Utána a nem specifikusan megtapadt próbát 0,1% SDS, 2xSSC oldatban, 65°C-on, kétszer 20 perces mosással távolítottuk el. Végül a membránt röntgen filmre exponáltuk majd a kapott képet „scannerrel" digitalizáltuk, és az Adobe Systems Adobe Photoshop programjával formáztuk és feliratoztuk.

3.9. Burgonya transzformáció

A burgonyanövények transzformációját DIETZE et al. (1995) levél-transzformációs módszerével Kondrákné Csanaki Csilla végezte.

3.10. Tranziens génexpressziós esszé

Tranziens *Agrobacterium* infiltrációs esszét KAPILA et al. (1997) nyomán végeztünk. A transzformációs vektort hordozó *A. tumefaciens* törzseket 5,6 pH-jú, acetosziringonnal kiegészített YEB tápoldatban (DIETZE et al. 1995) logaritmikus fázisig növesztettük (OD_{260}=0,8),

majd centrifugálás után MMA tápoldatban (KAPILA et al. 1997) háromszoros sűrűségűre szuszpendáltuk. A szuszpenziót 1-2 óráig 22°C-on állni hagytuk, majd injekciós fecskendővel infiltráltuk a levelek fonákja felől. A bakteriális szuszpenzió sikeres bejutását a szövetekbe jól láthatóvá tette azok színének elsötétülése. A *GUS* gén expresszióját a levelekben két nappal később hisztokémiai festéssel vizualizáltuk.

3.11. GUS aktivitás meghatározása

Fluorimetriás mérésekhez JEFFERSON (1987) módszerével a vizsgálandó szövetből nyers fehérjekivonatot készítettünk, amihez 4-metilumbelliferil-ß-D-glükuronid (MUG) szubsztrátot adtunk. A GUS enzim aktivitásának következtében keletkező 4-metilumlliferon (MU) termék mennyiségét ismert koncentrációjú standard mellett határoztuk meg 365 nm-es gerjesztési és 455 nm-es emissziós hullámhosszokon. Az össz-fehérje mennyiségét BRADFORD (1976) szerint mértük és a fluorimetriás aktivitásokat erre, illetve időegységre kivetítve fejeztük ki.

Hisztokémia festés céljából a mintákat 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glükuronsav (X-Gluc) szubsztrát oldatba mártottuk JEFFERSON (1987) szerint, és 37°C-on inkubáltuk. A reakció után a keletkezett kék termék (5,5'-dibróm-4,4'-diklór-indigó) észlelését gátló klorofillt többszöri, 70%-os etanolos mosással távolítottuk el.

4. EREDMÉNYEK

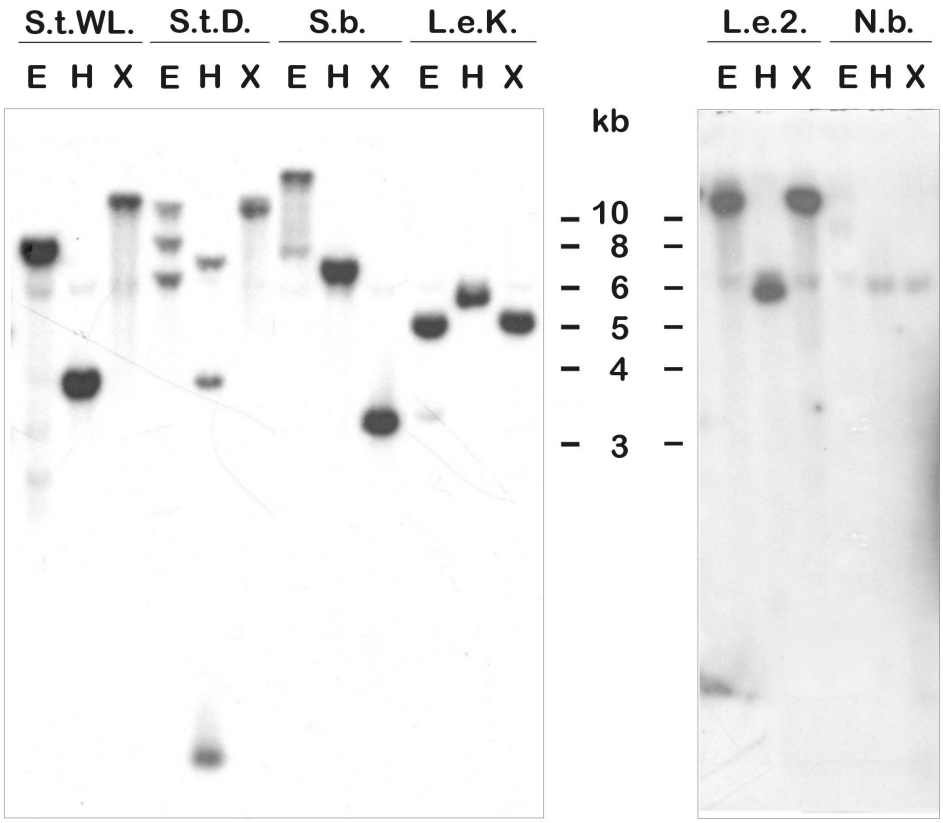
4.1. A *DS2*-vel homológ gének jelenléte és kópiaszáma *Solanaceae* fajokban

A DS2 cDNS klónt munkacsoportunk a *S. chacoense* vad burgonya fajból izolálta (SILHAVY et al. 1995). Southern hibridizációval megvizsgáltuk találunk-e a *DS2*-vel homológ géneket más, a *S. chacoense*-vel rokon fajokban is. Két termesztett burgonya fajtát, egy vad burgonya fajt, a *S. brevidens*-t, két termesztett paradicsom fajtát, és egy vad dohány fajt, a *N. benthamiana*-t teszteltük (2. ábra). Esetleges kereszt-hibridizációk elkerülése céljából hibridizációs próbaként a DS2 cDNS klón 68-440 bp közötti szakaszát izoláltuk és jelöltük meg radioaktív izotóppal. Ez a fragmentum csak a *DS2 ASR* génekhez nem homológ inzertjét tartalmazza. A növényi DNS mintákat *Eco*RI, *Hin*dIII vagy *Xba*I restrikciós enzimekkel emésztettük. White Lady burgonya fajtában, *S. brevidens*-ben, és a Korall és K252 paradicsom fajták esetében csak egy-egy erősen hibridizáló jelet kaptunk. Désirée burgonya fajtában *Xba*I emésztés után egy erősebb, míg *Eco*RI vagy *Hin*dIII emésztés során három-három egyenlő intenzitású, de viszonylag gyengébb jelet detektáltunk. A legtávolabbi rokonban, a *N. benthamiana*-ban csak egy nagyon gyenge, éppen csak látható hibridizációs jelet kaptunk. A *DS2* génnel erősen homológ gének tehát egy, vagy alacsony kópiaszámban

jelen vannak a vizsgált fajokban. A rendszertanilag távolabbi *N. benthamiana*-ban viszont csak nagyon gyenge kereszt hibridizációra képes szekvencia található, ami feltehetőleg olyan kismértékű homológiát jelent, hogy az már nem igazán tekinthető a *DS2* gén *N. benthamiana*-beli változatának. Désirée-ben a *DS2* gén vagy több kópiában vagy nagyobb polimorfizmussal van jelen, mint a másik vizsgált burgonya fajtában, a White Lady-ben. Ez utóbbi lehetőséget valószínűsíti az, hogy a burgonya tetraploid és nagymértékben heterozigóta, és a három hibridizáló jel közül az egyik méretében mindkét esetben megfelel az adott enzimmel emésztett White Lady mintában detektált jelnek.

4.2. Kísérletek a *DS2* gén funkciójának meghatározására

Munkánk kezdetén egyik kitűzött célunk a *DS2* gén funkciójának megállapítása volt. Ennek egyik lehetséges kísérleti megközelítése olyan transzgénikus burgonya növények előállítása, amelyek a gént vagy konstitutív módon expresszálják, vagy annak expressziója bennük a gén fordított irányban történő megnyilvánításával, antiszensz RNS-sel gátolt. Amennyiben a DS2 fehérjének lényeges szerepe van a szárazság-tolerancia kialakításában, úgy várhatóan az azt túltermelő növények szárazság-toleranciája valamilyen mértékben megnő, míg az antiszensz-gátoltaké csökken. Mivel az eredeti DS2 cDNS csonka klón volt, az 5’ végéről 14 nukleotid hiányzott, így ezt nem használhattuk a gén



2. ábra. A *DS2* gén jelenlétének vizsgálata különböző *Solanaceae* fajokban: *S. tuberosum* cv. White Lady (S.t.WL.), cv. Désirée (S.t.D.), *S. brevidens* (S.b.), *L. esulentum* cv. Korall (L.e.K.), cv. K262 (L.e.2.) és *N. benthamiana* (N.b.). A genomi DNS mintákat *Eco*RI (E), *Hin*dIII (H) vagy *Xba*I (X) enzimekkel emésztettük, blottoltuk, majd *DS2*-specifikus próbával hibridizáltuk.

konstitutív expressziójához. Helyette a DS2G (lásd 4.4. fejezet) genomi eredetű klón inzertjét építettük a pGA35N növény-transzformációs

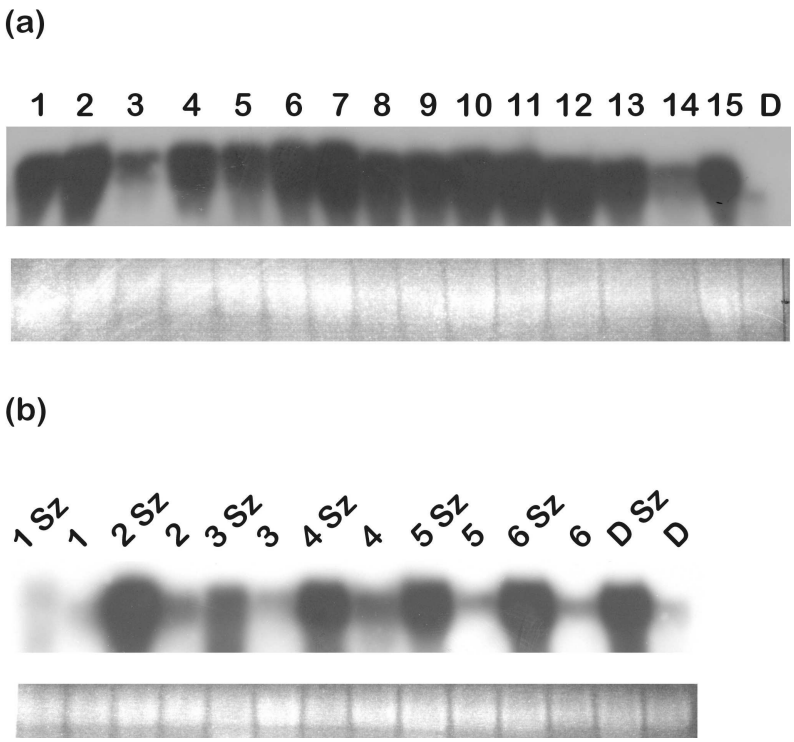
vektorba, *Kpn*I-*Xba*I fragmentumként, a konstitutív *35S* promoter kontrollja alá. A DS2 cDNS antiszensz orientációjának biztosításához első lépésként a pBluescript vektorban *Eco*RI-*Xho*I helyekre klónozott cDNS-t áthelyeztük a pGEM7 vektorba. A *Kpn*I és *Xba*I helyek ebben a vektorban az *Eco*RI és *Xho*I helyek pBluescript-beli helyzetéhez képest éppen fordítva helyezkednek el. Tehát a keletkezett pGEM7 alapú klónból *Kpn*I-*Xba*I emésztés után izolált fragmentum, a pGA35N *Kpn*I-*Xba*I helyeire ligálva egy antiszensz orientáltságú transzformációs vektort eredményezett.

A transzformációs vektorokkal burgonya White Lady fajtát transzformálva, 15 szensz és 25 antiszensz konstrukcióval transzformált vonalat regeneráltunk. A regeneránsok fejlődése, morfológiája nem volt eltérő a vad típustól. A *DS2* gén expressziójának mértékét a transzgénikus vonalak levelében northern hibridizációval ellenőriztük. Hibridizációs próbaként ugyanazt a *DS2*-specifikus próbát használtuk, mint a Southern hibridizációk során. A szensz vonalakból megfelelő vízellátottság mellett RNS-t izoláltunk, majd *DS2* próbával hibridizáltuk. A 15 vonalból 12-ben igen magas szintű *DS2* alapexpressziót mutattunk ki, tehát ezekben a növényekben a konstitutív *35S* promoter biztosítja a *DS2* magas szintű transzkripcióját (3.a ábra). A 25 antiszensz vonal leveléből megfelelő vízellátottság mellett és szárítás után is izoláltunk RNS-t, és ezeket szintén *DS2* próbával hibridizáltuk. A legtöbb vonalban azt tapasztaltuk, hogy transzformálatlan kontrollhoz hasonlóan a kezeletlen növényekben nem, míg a szárított mintákban nagy mennyiségben volt jelen a *DS2*

transzkriptum. Négy olyan növényt találtunk csak amelyben az antiszensz gátlás hatásos volt, azaz a szárított minták *DS2* mRNS szintje jelentősen csökkent (pl. 3.b ábra 3 számú vonal), illetve szinte teljesen el is tűnt (3.b ábra 1 számú vonal). Mivel az antiszensz RNS-t *35S* promoter irányítja, azt vártuk, hogy a kettős szálú *DS2* próbával a kezeletlen mintákban nagy mennyiségű antiszensz *DS2* RNS-t detektálunk. Ezt azonban, - ismeretlen okból - egy esetben sem tapasztaltuk. Legfontosabb válogatási szempontunk azonban a vízhiány-indukált *DS2* expresszió csökkenés volt, és ezt 4 vonalban meg is kaptuk. Ezt a 4 vonalat használtuk a további kísérletekhez.

A *DS2* túltermelő és gátolt vonalak levett leveleinek vízvesztését a súlycsökkenés mérésével analitikai mérlegen vizsgáltuk. A transzgénikus vonalak vízvesztése azonban, várakozásunkkal ellentétben, megegyezett a vad típuséval. A kiválasztott vonalakat ezután részletesebb, és a súlyvesztésnél érzékenyebb, a szárazságtűrés biofizikai paramétereit detektáló vizsgálatok céljából a Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem Növényélettani Tanszékén Dr. Horváth Gábor, és az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében Dr. Vass Imre rendelkezésére bocsátottuk. Sajnos azonban ők sem tudtak semmilyen változást kimutatni a transzgénikus vonalak stressz-toleranciájában.

Bár vizsgálataink szerint a *DS2* rendszertanilag nagyon szűk körben van jelen, az *ASR*-homológ gének, közöttük nem egy, a *DS2*-höz hasonlóan hidrofil inzerttel, széles körben elterjedtek a növényvilágban.



3. ábra. (a) A *DS2* gént *35S* promoter kontrollja alatt konstitutívan kifejező 15 transzgénikus burgonya vonal northern analízise. 1-15: transzgénikus volak, D: transzformálatlan Désirée kontroll.
(b) *35S* promoter kontrollja alatt antiszensz *DS2* RNS-t expresszáló transzgénikus burgonya vonalak northern analízise. 1-6: kezeletlen transzgénikus volak, 1Sz–6Sz: szárított transzgénikus volak, D: transzformálatlan Désirée kontroll. Az 1. mintában gyakorlatilag nem indukálódott a *DS2*, a 3.-ban indukciója jelentősen csökkent. Összesen 25 jelölt vonalat vizsgáltunk, az ábrán bemutatott 6 minta reprezentálja a *DS2* expresszióban megfigyelt változásokat. A 3.-hoz hasonló mértékű csökkenés még 2 esetben volt megfigyelhető.
Az alsó panelekben a megfelelő 28S rRNS-eket mutatjuk be, az egyenletes mintafelvitel, és RNS épség szemléltetéshez.

Vízhiány-indukálható expressziójuk alapján indokoltnak tűnik a feltételezés, hogy szerepük van a vízhiány-adaptációs folyamatokban. A *DS2* expresszió megváltoztatásával azonban nem sikerült fenotípusos változást előidéznünk. Ennek oka feltehetőleg a nagy mértékű redundancia, ami a sokféle stressz-indukált fehérjére (pl. LEA) jellemző a növényvilágban. Ezt alátámasztja az is, hogy ismereteink szerint nagyon kevés (pl.: XU et al. 1996) olyan közlemény született, amely arról számol be, hogy ismert enzimfunkcióval nem rendelkező stressz-gén expressziójával transzgénikus növények stressz-toleranciáját sikerült befolyásolni.

A DS2 fehérje jelenlétét, illetve mennyiségének változásait, antitest hiányában nem tudtuk kimutatni. Így csak a transzkripciós szint vizsgálatára, mint közvetett bizonyítékra támaszkodhattunk a vizsgált vonalak kiválasztásakor. Elképzelhető tehát, hogy esetleg nem sikerült a DS2 fehérjeszintet hatékonyan befolyásolni, ami szintén okozhatta a fenotípusos változás hiányát.

4.3. *DS2* gén expressziója különböző környezeti hatások során

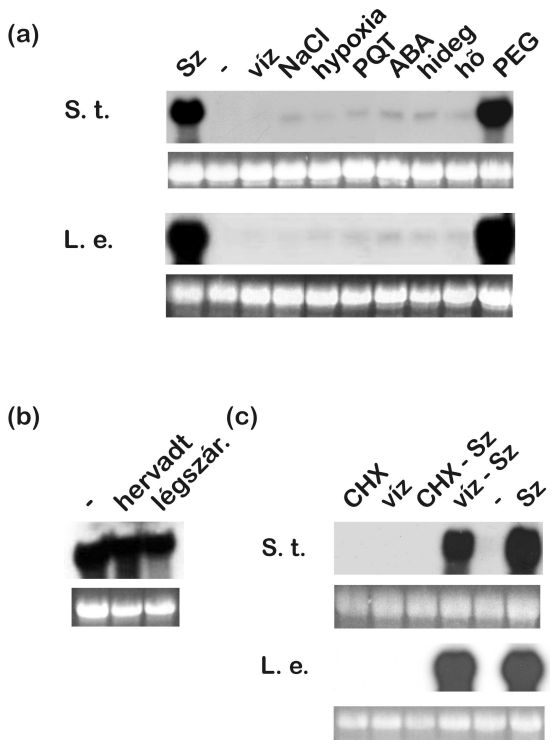
A *DS2* gén expresszióját burgonya és paradicsom növényekben northern hibridizációval vizsgáltuk. Hibridizációs próbaként itt is ugyanazt a *DS2*-specifikus próbát használtuk, mint a Southern hibridizációk során. A megfelelően öntözött növények leveleiben a *DS2* transzkriptum nem volt

kimutatható, míg légszárított levelekben a *DS2* mRNS szint nagyon erős indukcióját tapasztaltuk. Ezzel szemben ABA kezelés hatására a *DS2* expressziója csak jelentéktelen mértékben emelkedett (4a. ábra). Az ABA szerepét a *DS2* szabályozásában egy ABA bioszintézis (*aba*) mutáns paradicsom vonal, a *sitiens* vizsgálatával is teszteltük. Az ABA hiánya miatt a *sitiens* növények megfelelő öntözés mellett is hervadásos tüneteket mutattak. Amint a 4.b ábra northern hibridizációján látható *sitiens* növényekben jelentős *DS2* expresszió volt detektálható nemcsak a légszárított levelekben, és az egy hétig öntözetlen növényekben, hanem a szokásos vízellátásban részesülő mintákban is. A kísérletet négy alkalommal ismételtük meg, különös figyelmet fordítva e növények megfelelő öntözésére, de mindannyiszor ugyanezt az eredményt kaptuk. Ennek feltehetőleg a *sitiens* növények elégtelenül működő vízháztartása az oka. A *DS2* expressziójának magas szintje egy ABA-mentes növényben azonban alátámasztja azt, hogy a gén szabályozása nem ABA-függő.

A *DS2* indukciója tehát nemcsak *S. chacoense*-ben független az ABA-tól, hanem a termesztett burgonyában és paradicsomban is, ellentétben a többi *ASR* homológ génnel, amelyek viszont ABA-indukálhatóak. A szekvencia homológia alapján valószínű, hogy a *DS2* és a többi *ASR*-homológ gén funkciója hasonló lehet, azonban közöttük mégis figyelemre méltó különbség mutatkozik a génexpresszió szabályozásában.

A szignál transzdukciós útvonalak közötti átfedések gyakorisága miatt a vízhiány mellett más stresszek hatását is megvizsgáltuk. Só, hypoxia, oxidatív stressz, hideg vagy hő kezelések ugyanolyan jelentéktelen hatással voltak a *DS2* expresszióra, mint az ABA kezelés (4.a ábra). Ugyanezeket az eredményeket kaptuk azokban az estekben is, amikor a 4. ábrán bemutatott kísérleteknél az Anyag és módszer fejezetben leírt rövidebb idejű stressz-kezeléseket alkalmaztuk. Az ozmotikus aktivitása miatt vízvesztést okozó PEG kezelés viszont ugyanolyan mértékű *DS2* indukciót okozott, mint a légszárítás. Tehát a *DS2* expressziójára csak a kiszáradás van lényeges hatással.

Az ABA szerepe a vízvesztés-indukált génexpresszióban jól ismert, csakúgy, mint a vízhiány és a hideg jelátvitele közötti kapcsolat (1. ábra). Legalább négy útvonal vesz részt a vízhiány válaszban: kettő közülük ABA-közvetített, kettő pedig nem. Ismertek az ABA-közvetített útvonalak *cisz*-elemei, a MYCR/MYBR és ABRE elemek, valamint azonosították az ezeknek megfelelő MYC/MYB és b-ZIP transzkripciós faktorokat is. Továbbá a magasabb rendű jelátviteli gének között is vannak részletesen jellemzettek, mint például az *abi1-2*, vagy az *era*. Egy másik útvonal ABA-tól függetlenül szabályozza például az *rd29*, az *lti78* és a *cor15a* géneket, amelyek promotereiben DRE/CRT *cisz*-elemek találhatóak. Ez az útvonal összefut egy hideg-indukálható útvonallal, és mindkettő transzkripciós faktorai, a DREB1-2, és a CBF faktorok, valamint további jelátviteli gének is ismertek (összefoglaló: SHINOZAKI et al. 2000).



4. ábra. (a) A *DS2* gén expressziós analízise burgonyában és paradicsomban, különböző környezeti feltételek mellett. Sz: légszárított levelek; -: kezeletlen; víz: desztillált víz; NaCl: 200mM NaCl; 8 h, hypoxia: hypoxia 12 h árasztással; PQT: 100 μM paraquat, 4 h; ABA: 200 μM ABA sötétben, 24 h; hideg: hidegkezelés, 4°C, 48 h; hő: hőkezelés, 42°C, 6 h; PEG, 20 %-os PEG oldat, 24 h.
(b) *DS2* expresszió egy ABA bioszintézis mutáns paradicsom vonalban (*sitiens*). -: kezeletlen, hervadt: 1 hétig öntözetlen növény, légszár.: légszárított levél.
(c) Cikloheximid hatása a *DS2* expresszióra burgonyában és paradicsomban. Levett leveleket 8 óráig vagy 300 μM cikloheximidbe (CHX) vagy desztillált vízbe (víz) állítottunk. CHX – Sz jelöli azokat a leveleket, amelyeket cikloheximid kezelés után, víz – Sz pedig azokat amelyeket víz kezelés után légszárítottunk. -: kezeletlen, Sz: légszárított kontroll.
Az alsó panelekben a megfelelő 28S rRNS-eket mutatjuk be, az egyenletes mintafelvitel, és RNS épség szemléltetésre.

Létezik azonban még egy útvonal, ami mind az ABA-tól, mind hidegtől független: ez szabályozza az *Arabidopsis erd1* (KIYOSUE et al. 1993), *rd19* és *rd21* (KOIZUMI et al. 1993) expresszióját. Az *erd1* egy CLP proteáz regulátor alegységet kódol, az *rd19* és az *rd21* pedig különböző tiol proteázokat. Az *erd1* gén egy 0,9 kb promoter szakasza GUS riporter gént vízhiány és só hatására indukált, továbbá fejlődési kontroll alatt is áll, mert szeneszcens levelekben is működésbe lép (NAKASHIMA et al. 1997). Az *erd1*-et szabályozó szignál transzdukciós mechanizmusból azonban sem *cisz*-elemet, sem transzkripciós faktort, sem más jelátviteli komponenst nem ismerünk (SHINOZAKI et al. 2000). A 3.a ábrán látható northern hibridizációk az mutatják, hogy a *DS2* gén burgonyában és paradicsomban hasonló irányítás alatt áll, mint az *Arabidopsis erd1* gén, sőt specificitása némileg nagyobb, hiszen só hatására sem indukálható.

A növények természetes közegében a vízhiány gyakran párosul magas hőmérsékletekkel. Emellett a vízhiány okozta sztómazáródás miatt csökken a CO_2 ellátottság is, így a fotoszintetikus elektrontranszportból elszabadult elektronok reaktív oxigéngyököket képeznek, ami végül is oxidatív stresszt okoz. Habár az elárasztás nem jelent vízhiányt, az így kialakuló alacsony oxigén ellátottságú állapot (hypoxia) az endogén ABA szint emelkedését eredményezi (ZHANG et al. 1987). SIDDIQUI et al. (1998) viszont arról számoltak be, hogy a vízhiány-indukálható *DC3* répa gént transzgénikus dohány növényekben a hypoxia ABA-független módon is indukálta. Az *ASR*-homológ gének expresszióját vízhiány és

ABA indukálja, az általunk vizsgált többi stressz faktor hatását expressziójukra nem ismerjük. A *DS2* gén expressziója viszont vízhiány-specifikusnak tűnik, mind burgonyában, mind paradicsomban. Ez - figyelembe véve a különböző szignál mechanizmusok közötti intenzív kommunikációt - meglehetősen kivételes jelenségnek számít.

Az újonnan szintetizált fehérje faktorok szerepét a *DS2* szabályozásában egy hatékony fehérje szintézis gátló vegyszer, a cikloheximid alkalmazásával vizsgáltuk. Szárítás előtt a leveleket vagy vízzel vagy cikloheximiddel előkezeltük. Vizes előkezelés után a szárítás erős *DS2* indukciót okozott, viszont a cikloheximid előkezelés megakadályozta ezt (4.c ábra). Tehát a *DS2* expresszió *de novo* szintetizált protein faktorokat igényel. A fehérjeszintézis szerepét főleg *Arabidopsis*-ban megismert szignál transzdukciós mechanizmusok esetében vizsgálták. Myc és Myb faktorok által szabályozott ABA-indukálható gének expressziójához szükségesek *de novo* szintetizált fehérje faktorok (ABE et al. 1997, IWASAKI et al. 1995). Az *OsEm* és a *rab16A* ABRE-n keresztül szabályozott gének indukciójához szintén szükség van fehérje szintézisre, míg más ABRE szabályozott génekéhez nem (SHINOZAKI et al. 1997).

4.4. *DS2* genomi klónok izolálása és jellemzése

A burgonya *DS2* génjének vízhiány specifikus expressziója valószínűleg egy ritka jelenség a növényvilágban. A gén szabályozó régiójának megismeréséhez izoláltuk és szekvencia szinet jellemeztük a *DS2* gént.

A White Lady burgonya vonal genomi klóntárat λ DASH II replacement vektorban Dr. Bánfalvi Zsófia készítette el. Ezt szűrtük a *DS2*-specifikus próbával az Anyag és módszerben leírt plakk hibridizáció módszerével. Két független fág klónt izoláltunk, amelyek hibridizáltak a próbával. Az egyikből izoláltunk egy 3-kb-os, a DS2 cDNS-sel hibridizáló *Eco*RI-*Hin*dIII fragmentumot, amit aztán pBluescript II KS plazmid vektorba klónoztunk. A keletkezett plazmid klónt DS2G-nek neveztük el. A fragmentum 5' végének szekvenciája alapján kiderült, hogy az a transzkripcionális start kodontól felfelé csak 234 bp feltételezett promoter régiót tartalmaz, valamint, hogy ez a fág bal karjától lefelé eső szakasz, tehát ebben a fág klónban további promoter szekvencia már nem található. Ezért a másik fág klónból is izoláltunk egy 3-kb-os *DS2*-vel hibridizáló *Hin*dIII fragmentumot, amit szintén pBluescript II KS plazmid vektorba klónoztunk. A keletkezett plazmid klónt DS2H-nak neveztük el. Ez a klón 498 bp feltételezett promoter régiót tartalmazott. Ebből a fág DNS-ből izoláltni tudtunk egy, a DS2G 5' végével hibridizáló *Eco*RI-*Pvu*II fragmentumot is, amit ugyanabba a vektorba építve, mint az előző fragmentumokat, kaptuk a DS2J klónt. A DS2J 1140 bp feltételezett

promoter régiót tartalmazott, valamint a fág bal karjának végét, vagyis ez volt a leghosszabb promoter régió, amit izolálni tudtunk.

Az eredetileg izolált DS2 cDNS egy csonka klón volt, a transzkripciós start kodon hiányzott róla. A DS2G szekvencia analízise feltárta, hogy a burgonya *DS2* gén (*StDS2*) 14 további bázispárt tartalmaz, amelyek a MAEQK N terminális aminosav szekvenciát kódolják. Ez erősen homológ a többi *ASR* gén megfelelő N terminális részével. Az *StDS2* kódoló régiója (M3 melléklet; génbanki azonosító: AJ320154) majdnem teljesen azonos a *S. chacoense* cDNS szekvenciával (génbanki azonosító: U12439): közöttük a szekvencia homológia 99,35% DNS szinten, ami aminosav szinten egy S-R és egy K-Q cserét okozott a 42. és a 119. pozíciókban. Az *StDS2* kódoló régióját a 621. helyen egy 263 nukleotid hosszú intron szakítja meg (5.a ábra).

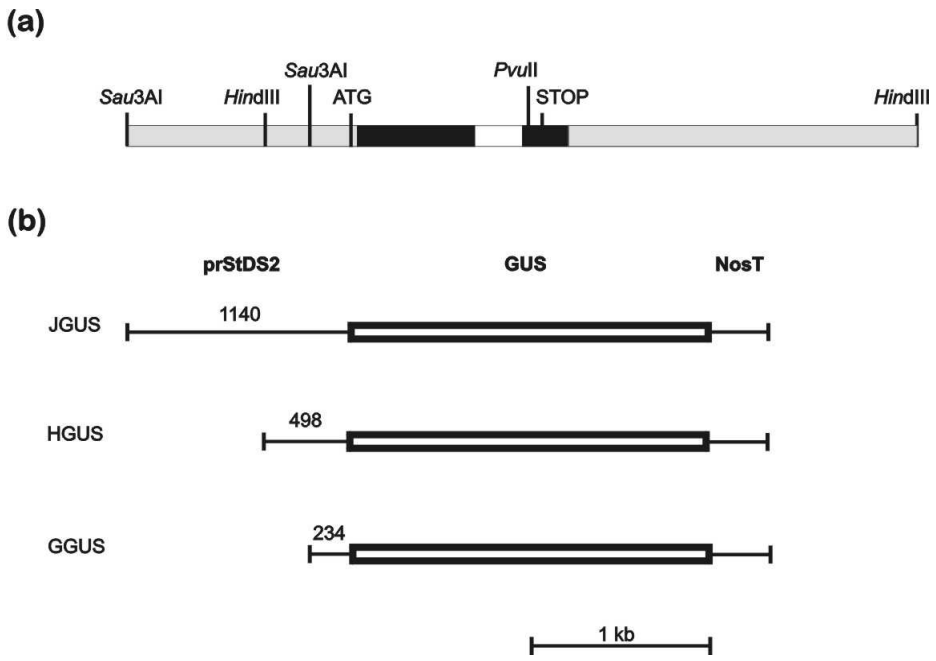
Az 1140 bp feltételezett promoter szakasz (M3 melléklet; génbanki azonosító: AJ320154) nem homológ semmilyen ismert szekvenciával. Benne a PLACE növényi promoter *cisz*-elem kereső adatbázis szerint a 832. pozícióban egy CTAACCA motívum található, ami az *Arabidopsis rd22* gén promoterében megtalálható MYB kötő hellyel azonos (ABE et al.,1997). Más vízhiány-indukálható *cisz*-elemet sem a PLACE, sem a PantCARE adatbázisokban nem találtunk. A MYB kötőhely tényleges szerepe a *DS2* regulációban azonban meglehetősen bizonytalan, hiszen a *DS2*, ellentétben az *rd22*-vel, ABA-tól független módon szabályozott. Ráadásul az *rd22* szabályozását egy 67 bp-os szakaszra lokalizálható szekvencia biztosítja, amelyben többféle, pozitív

és negatív szabályozó *cisz*-elem található. A gén expresszióját feltehetőleg az ezekhez a helyekhez kapcsolódó fehérjék kölcsönhatásai alakítják ki. A MYB faktor egy MYC faktorral kooperatív módon indukálja az *rd22*-t, a MYC elem eltávolítását követően a MYB elem önmagában csak minimális génaktiválásra képes.

4.5. *StDS2* promoter::*GUS* fúziós konstrukciók előállítása

A burgonya genomból izolált feltételezett promoter szekvencia transzkripciós aktivitásának igazolására a két promoter fragmentumot a *GUS::NosT* riporter konstrukció elé építettük. A β-glükuronidáz (*GUS*) gént, a transzkripció terminációs szekvenciával együtt a pDV437 plazmidból *Bam*HI-*Not*I fragmentumként izoláltuk, majd a pCP60 bináris vektorba klónoztuk. Így kaptuk a pCP/GUS plazmidot, amely a *35S* promotert tartalmazta a *GUS* gén előtt. Annak érdekében, hogy a pCP60-ból készített pCP/GUS *Xba*I helye egyedüli hely maradjon, a klónozást megelőzően eltávolítottuk a pDV437 plazmidban található *Xba*I helyet úgy, hogy azt Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd összeligáltuk.

A DS2G klónból a transzláció iniciációs kodonhoz képest –1 - -20 szekvenciára specifikus DS2PROM primert (5'-GATGTTTTTTGGTGATAATT–3') és a pBluescriptre specifikus T3 primert használva, a 234 bp promoter szakaszt PCR reakcióval felszaporítottuk, és *Xba*I emésztést követően a pCP/GUS vektor *Xba*I-



5. ábra. (a) A *DS2* gén genomi szerveződése burgonyában. A DS2 cDNS-nek megfelelő szekvenciákat fekete, az intronnak megfelelő szekvenciát fehér színnel jelöltük. A klónozásokhoz használt restrikciós helyeket a vonalak felett tüntettük fel. Az ATG és STOP a transzlációs iniciációs és terminációs kodonokat jelöli. (b) Növényi transzformációs kiméra vektor konstrukciók, amelyek az *StDS2* promoter szakaszból (prStDS2), *GUS* riporter génből (GUS) és *Nos* terminátor szekvenciából (NosT) állnak. A *DS2* promoter fragmentumok hossza bázispárban van megadva.

*Sma*I helyeire klónoztuk. A vektorból ezután *Hin*dIII-*Xba*I emésztéssel, és a keletkezett ragadós végek feltöltésével, majd összeligálásával

eltávolítottuk a *35S* promotert. Az így kapott bináris vektort pGGUS-nak neveztük el (5.b ábra).

A DS2H klónból a pGGUS készítéséhez is felhasznált primer párral felszaporítottuk a 498 bp promoter szakaszt és *Sma*I-*Hin*dIII fragmentumként a pGEM7 vektorba klónoztuk. Ebből a klónból az inzertet izoláltuk és *Sma*I-*Hin*dIII fragmentumként a pCP/GUS vektorba klónoztuk a GUS gén elé, a *35S* promoter helyére. Ezt a klónt pHGUS-nak neveztük el (5.b ábra).

A DS2J klónból ugyanezzel a primer párral felszaporítottuk az 1140 bp promoter régiót és a pBluscript II KS vektor *Sma*I helyére klónoztuk. A pCP/GUS vektorból *Hin*dIII és *Bam*HI emésztéssel eltávolítottuk a *35S* promotert. A *Hin*dIII helyet Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd a *DS2* promotert *Sma*I-*Bam*HI fragmentumként a GUS gén elé ligáltuk. Ezt a klónt pJGUS-nak neveztük el (5.b ábra).

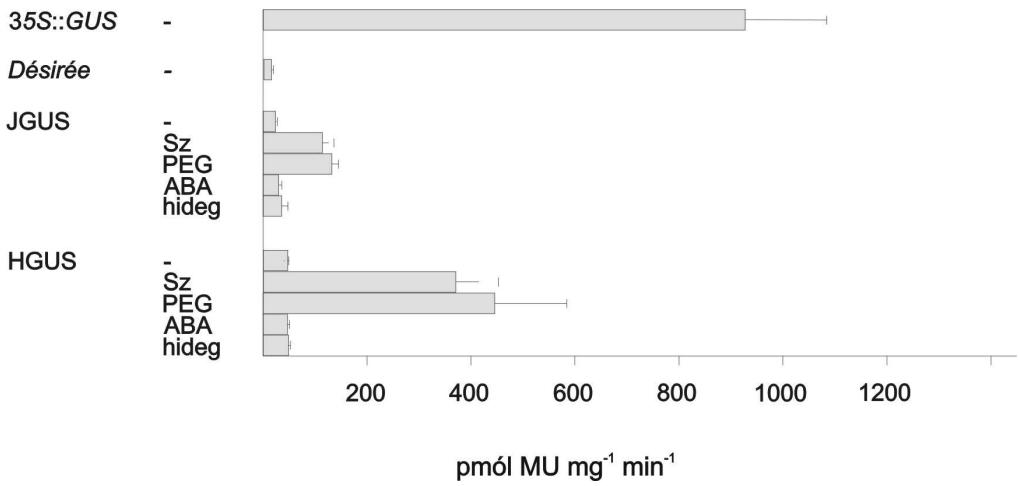
4.6. A promoter aktivitás detektálása transzgénikus burgonya növényekben

Transzgénikus burgonya vonalakat, amelyek vagy a GGUS, vagy a HGUS, vagy a JGUS konstrukciót, valamint a kanamycin tartalmú táptalajon szelekciót biztosító *npt*II gént hordozzák, *Agrobacterium* közvetítette transzformációs eljárással hoztuk létre. A GGUS konstrukcióval – valószínűleg technikai okok miatt - nem sikerült hajtást

regenerálni, míg 18 JGUS és 97 HGUS kanamycin rezisztens transzgénikus burgonya vonalat kaptunk. A *DS2* promoter aktivitást vonalanként egyenként teszteltük levett, 48 órán át 20%-os PEG-be állított levelek hisztokémiai festésével, X-Gluc szubsztráttal (7.a ábra). 2 JGUS és 7 HGUS vonal mutatott látható GUS aktivitást. Öt feltehetőleg azonos transzformálási eseményből származó HGUS vonal azonban nagyon alacsony GUS aktivitást mutatott, feltehetőleg pozíció hatás miatt. Ezért a további kísérletek során csak a 2 JGUS és a két erős festődést mutató HGUS vonalakat használtuk.

A növényeket *in vitro* felszaporítottuk, majd üvegházi cserepekbe ültettük át, amelyeket rendszeresen öntöztünk. Kezeletlen, szárított és PEG kezelt levelek GUS aktivitását fluorimetriásan mértük (6. ábra). Kezelés nélkül a transzgénikus vonalak enyhén magasabb fluorimetriás aktivitást mutattak, mint a transzformálatlan Désirée vonalak.

Egy hetes vízmegvonás után, vagy levett levelek 48 órán át tartó 20%-os PEG oldatban történt kezelése után mind a négy *DS2* promotert hordozó transzgénikus vonal GUS aktivitása határozott emelkedést mutatott. Ez azt bizonyítja, hogy a szárazság-indukálható transzkripciós aktivitáshoz szükséges *cisz*-elemeket mindkét vizsgált promoter szakasz tartalmazza. A GUS aktivitás ugyanakkor nem változott 12 órás ABA,



6. ábra Kezelések hatása különböző konstrukciókat hordozó transzgénikus burgonya levelek GUS aktivitására. -: kezeletlen; Sz: egy hét vízelvonás; PEG: 20%-os PEG oldat, 48 h; ABA: 200 µM ABA, 24 h; hideg: 4°C, 48 h. Transzformálatlan Désirée növényeket használtunk negatív, és *35S*::*GUS* konstrukciót hordozó növényeket használtunk pozitív kontrollként. Az oszlopok két-két független JGUS ill. HGUS transzgénikus vonal mérésével kapott átlagos értékeket jelölnek. A kísérleteket három ismétlésben végeztük. A hiba vonalak a standard hibát jelölik. A specifikus GUS aktivitást pmol 4-metilumbelliferil-β-D-glükuronid mg^{-1} fehérje min^{-1} dimenzióban adtuk meg.

48 órás hideg kezelés hatására. Tehát mindkét promoter szakasz elégséges ahhoz, hogy fenntartsa a *DS2* szabályozásának specifikus természetét. Pozitív kontrollként CaMV *35S::GUS* konstrukciót hordozó transzgénikus burgonya növényeket használtunk, amelyek minden kísérletben igen magas szintű GUS aktivitást mutattak (6. ábra).

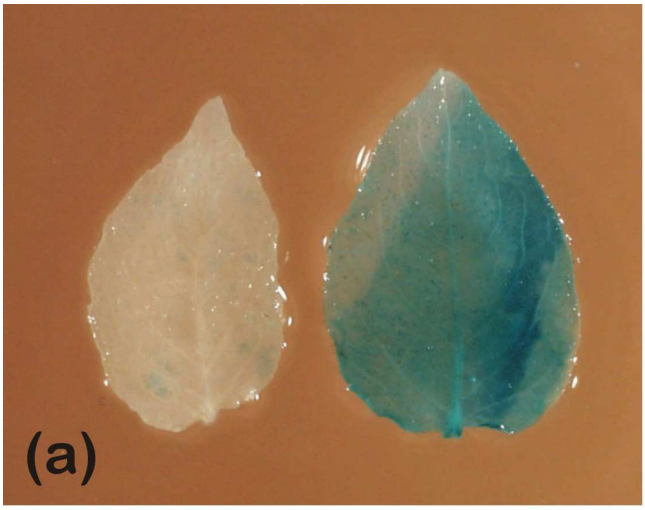
Az ABA- stressz- és termésérés-indukálható paradicsom *ASR2* gén 1,24 kb feltételezett promoter szakaszának aktivitását kiméra GUS konstrukcióval szintén vizsgálták transzgénikus burgonya és paradicsom növényekben (ROSSI et al. 1998). A transzgénikus burgonya vonalak GUS aktivitás értéke nagy szórást mutatott, közöttük néhány igen magas alapértékkel, csakúgy, mint a paradicsom vonalak, amelyeknek mindegyike magas alapaktivitással rendelkezett. Ezek az aktivitás értékek azonban ABA kezelés hatására sem változtak. A vizsgált promoter szakasz tehát feltehetőleg nem hordoz minden, a specificitás kialakításáért felelős elemet. A *DS2* és az *ASR* gének promoterei nem homológok, és bár stressz faktorok hatását az *ASR2* promoter aktivitására nem vizsgálták, a rendelkezésre álló adatok alapján mégis valószínű, hogy a gének kódoló szakaszának homológiája ellenére a két promoter eltérő szabályozási mechanizmus kontrollja alatt áll.

Érdemes megjegyezni, hogy az *ASR2*::*GUS* konstrukciót hordozó 44 transzgénikus burgonya vonalból csak kilencben volt detektálható GUS aktivitás. A mi kísérleteinkben 115 *StDS2*::*GUS* transzgénikus vonalból 9 volt aktív. Elképzelhető tehát, hogy a stressz-indukálható promoterek jobban érzékenyek az integráció helyére, mint a konstitutív promoterek, amelyek a szelekciós markert működtetik. Ezt alátámasztják azok az eredmények, amelyek szerint a kromatin struktúra hatással van egyes ABA-indukálható gének expressziójának szabályozása (összefoglaló: BUSK et al. 1998).

4.7. Az *StDS2* promoter aktivitásának vizsgálata dohányban

A burgonya növényekben aktív *StDS2* promoter szakasz működését tranziens génexpressziós esszével egy másik fajban is megvizsgáltuk. A szintén a *Solanaceae* családba tartozó *N. benthamiana* vad dohányfaj előzetes ismereteink szerint különösen alkalmas volt egy *Agrobacterium* infiltrációs vizsgálatra, és genomjában a *DS2* génnel csak nagyon gyenge kereszt hibridizációt mutattunk ki. HGUS konstrukciót hordozó *Agrobacterium* szuszpenziót infiltráltunk *N. benthamiana* levelekbe, amelyek várakozásainknak megfelelően könnyen felvették a szuszpenziót. Utána mintáinkat két napig vagy szárítottuk, vagy megfelelően öntöztük. A 498 bp *StDS2* promoter szekvencia által szabályozott *GUS* gén működését X-Gluc festéssel vizualizáltuk. A szárított levelekben sokkal intenzívebb kék festődést tapasztaltunk, mint a negatív kontrollok esetében (7.b ábra).

A *DS2* expresszióját szabályozó szignál transzdukciós mechanizmus tehát valószínűleg általánosan jelen van a *Solanaceae* családban, függetlenül a *DS2* gén jelenlététől. Ennek alapján feltételezhető, hogy léteznek más olyan gének is, amelyeket az általunk vizsgált mechanizmus szabályoz.



7. ábra. A 498 bp *StDS2* promoter szakasz aktivitásának vizsgálata hisztokémiai festéssel.
(a) Transzgénikus burgonya: a bal oldali levél kezeletlen, a jobb oldali vízhiányos.
(b) *Agrobacterium* infiltrációs tranziens esszé *N. benthamiana*-ban: a bal oldali levél kezeletlen, a jobb oldali vízhiányos.

4.8. Új tudományos eredmények

Munkánk célja a *S. chacoense*-ből csoportunkban SILHAVY et al. (1995) által izolált, vízhiány-indukálható *DS2* gén további vizsgálata volt. Vizsgáltuk a gén elterjedését, funkcióját és szabályozását. Új tudományos eredményeinket a követezőekben foglalhatjuk össze:

1. Genomi Southern hibridizációval vizsgáltuk a *DS2*-vel homológ gének jelenlétét különböző fajokban. Megállapítottuk, hogy a gén jelen van a termesztett burgonyában, egy gumótlan vad burgonya fajban, a *S. brevidens-ben*, valamint paradicsomban is, dohányban viszont csak nagyon gyenge kereszt hibridizációt mutat. A gén valószínűleg egy kópiás vagy nagyon alacsony kópiaszámú.

2. A *DS2* gén funkcióját annak expressziós szintjének megváltoztatásával vizsgáltuk. Transzgénikus burgonya növényeket hoztunk létre, amelyek a *DS2* gént vagy konstitutívan kifejezik, vagy annak expressziója bennük antiszensz RNS-sel gátolt. Az expressziós szint megváltoztatása azonban nem okozott fenotípusos változást a transzgénikus vonalakban vízhiány esetén sem, így a *DS2* funkciója továbbra is ismeretlen maradt.

3. A gén szabályozását először northern analízissel vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a vízvesztés, - akár légszárítás, akár PEG

kezelés hatására lép fel - igen nagymértékben indukálja a *DS2* expresszióját. Ez az indukció azonban ABA-tól független, és más abiotikus stresszek, mint só, hideg, hő, oxidatív stressz vagy hypoxia sincsenek rá hatással. Cikloheximid kezeléssel megállapítottuk, hogy a gén indukciójához *de novo* szintetizált fehérje faktor(ok)ra van szükség. A *DS2* expressziós mintázata burgonyában és paradicsomban megegyezik.

4. A *DS2* gén szabályozásának részletesebb tanulmányozása céljából izoláltuk annak genomi kópiáját *S. tuberosum*-ból. Megállapítottuk, hogy a burgonya *StDS2* gén tartalmaz egy 263 nukleotid hosszú intront, és az 5' végén csonka *S. chacoense* cDNS-hez képest 14 további nukleotidból áll a transzlációs iniciáció helyig. A két gén között 99,35% homológia van DNS szinten, ami aminosav szinten két cserét eredményez. 1140 nukleotid feltételezett promoter szakaszt izoláltunk, ami nem homológ semmilyen ismert szekvenciával.

5. Az *StDS2* promoter aktivitásának vizsgálatához létrehoztunk 3 növény-transzformációs vektor konstrukciót. Ezekben a *GUS* riporter gén elé 234 (pGGUS), 498 (pHGUS), illetve 1140 (pJGUS) bp *DS2* promoter szakaszt építettünk.

6. *A. tumefaciens* közvetítette transzformáció után izoláltunk 2-2 olyan transzgénikus burgonya vonalat, amelyek a HGUS, illetve a JGUS konstrukciót hordozzák, és GUS aktivitásuk vízhiány hatására indukálható. Ez az indukció megőrizte specificitását, mivel akárcsak az endogén *DS2* gén esetében, sem az ABA, sem a hideg kezelés nem volt rá hatással. Az *StDS2* promoter 498 bp szakasza tehát hordozza a *DS2* génre jellemző szabályozáshoz szükséges és elégséges elemeket.

7. *Agrobacterium* infiltrációs tranziens esszével megállapítottuk, hogy ez a 498 bp *DS2* promoter szakasz vízhiány-indukálhatóan működőképes dohányban is.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Csoportunk korábban *S. chacoense* vad burgonya fajból izolált egy vízhiány által ABA-tól függetlenül erősen indukálódó gént, a *DS2*-t. Munkánk fő célja e gén funkciójának és szabályozásának megismerése volt.

A *DS2* gén funkcióját, a gén expressziós szintjének megváltoztatásával vizsgáltuk transzgénikus burgonya növényekben. Ez a módszer ismeretlen funkciójú gének vizsgálatának széles körben alkalmazott megközelítési módja. A *DS2* esetében azonban a gén expressziós szintjének megváltoztatása nem járt együtt fenotípusos változással. Elképzelhető, hogy a nagyszámú stresszfehérje redundanciája miatt egy gén expressziójának megváltozásával járó hibákat elfedi a többi gén hatása. A *DS2* gén funkciójára szekvenciája, expressziós mintázata közvetett bizonyítékként szolgál. A vízhiány károsító hatásai elleni tényleges védő szerepét azonban esetleg alternatív kísérleti megközelítésekkel lehetne igazolni. Ilyen lehet például a gén kifejeztetése élesztőben. Az élesztő saját stresszvédő mechanizmusai mellett azonban természetesen szintén elképzelhető, hogy a DS2 jelenléte nem okozna mérhető javulást. Ez kiküszöbölhető lenne úgy, hogy a *DS2* gént olyan stressz szignál transzdukció mutánsokban (pl. *SNF*, *Míg*, *Hog*) expresszáltatnánk, amelyekben az élesztő stresszgének indukciója nem megfelelően működik.

Igazoltuk, hogy a *DS2* gén burgonyában és paradicsomban vízhiány hatására, ABA-tól, illetve más stresszhatásoktól független módon, jelentős mértékben indukálódik. *S. tuberosum* genomból izoláltuk a *DS2* gént (*StDS2*), és annak 1140 bp promoter szakaszát. *GUS* reporter gén alkalmazásával megállapítottuk, hogy ebből 498 bp hordozza a specifikus expressziót biztosító *cisz*-elemeket. Ozmolitok vagy transzkripciós faktorok alkalmazásával mára számos javított stressztűrő képességű transzgénikus növényt sikerült előállítani. Általános probléma viszont, hogy e növények optimális körülmények között gyakran jelentős növekedési hátrányban vannak a vad típussal szemben. Ennek oka a konstitutív promoterek alkalmazásában keresendő, mivel ezek a növények forrásaikat így akkor is a transzgén expressziójára és az ozmoprotektánsok termelésére fordítják, amikor arra nincs szükségük. Az ilyen irányú biotechnológiai fejlesztésekhez tehát stressz-indukálható promoterek alkalmazására van szükség. A GM fajták termesztésének várható elterjedésével együtt feltehetőleg a stressztűrő fajták iránt is jelentős gazdasági igény jelentkezik. Bár már számos stressz-indukálható promotert izoláltak, az *StDS2* promoter specificitása olyan nagymértékű hogy, alkalmazása előnybe kerülhet más promoterekkel szemben. Az alternatív megközelítések körét azért is indokolt tágítani, mert az izolált szekvenciák felhasználhatóságát gyakran szabadalmi oltalmak korlátozzák. Csoportunkban már folyamatban van a *DS2* promoter gyakorlati irányú alkalmazhatóságának vizsgálata. A trehalóz szintézisért felelős, élesztő erederű *TPS1* gént fúzionáltattuk a *DS2* promoterrel, és az

így létrehozott konstrukcióval transzgénikus burgonya növényeket állítunk elő.

A gyakorlati felhasználás mellett az *StDS2* promoter további vizsgálata a vízhiány szignál transzdukciós mechanizmusainak további megismeréséhez is hozzájárulhat. Az ABA-közvetített és a hideg által is indukálható jelátvitel elemeit meglehetősen jól ismerjük. Ezzel szemben, sem *cisz*- sem *transz*-elemeket nem ismerünk az ezektől a faktoroktól függetlenül szabályozott géneket aktiváló mechanizmus(ok)ból. A *DS2*-t szabályozó *cisz*- és *transz*-elemek azonosításának egyik lehetséges megközelítési módja az ún. „band-shift”, majd a fehérje „foot-print” technikák, végül az élesztő egyhibrid teszt alkalmazása lehet. Az általunk elkészített GGUS konstrukció aktivitásának vizsgálata jelenleg is folyamatban van. Ez a konstrukció csak 234 bp *StDS2* promoter szakaszt tartalmaz, így pozitív eredmény esetén a további vizsgálatokat egy erőteljesen leszűkített DNS régióra koncentrálhatjuk.

A *DS2* szabályozásának megismerésében jelentős előrelépés lehet a promoter aktivitásának tesztelése *Arabidopsis*-ban. Ez egyrészt megmutatná, hogy a *Solanaceae* családon kívül mennyire konzerválodott a *DS2*-t szabályozó mechanizmus. Másrészt a rendelkezésre álló nagy számú *Arabidopsis* szignál transzdukciós mutáns bevonásával pontosabb képet kaphatnánk e mechanizmus elemeiről. A jelátviteli elemek azonosításának másik megközelítési lehetősége az „aktivációs tagging” rendszer. Ennek lényege, hogy a promoter::riporter konstrukciót hordozó transzgénikus növényeket egy erős konstitutív promoterrel

felültranszformálják. Mivel a riporter gént nem indukáló körülmények között is erősen expresszáló dupla transzformáns növényekben a konstitutív promoter nagy valószínűséggel a szignál transzdukció egyik elemét aktiválta, ez a beépülési hely klónozásával izolálhatóvá és megismerhetővé válik. A *DS2* promoter vizsgálata *Arabidopsis*-ban - együttműködésben az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében Dr. Szabados László csoportjával - már folyamatban van. A kutatási terv megvalósítását az OTKA támogatja (T038375).

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A környezeti stresszhatások számos növényi gént indukálnak, több, egymással sok helyen összekapcsolt szignál transzdukciós mechanizmuson keresztül. A csoportunk által korábban *Solanum chacoense*-ből, egy vad burgonyafajból izolált *DS2* gén vízvesztés hatására nagymértékben indukálódik. Ez az indukció azonban, ellentétben a legtöbb leírt stressz-indukálható génnel, nem idézhető elő abszcizinsav (ABA) kezeléssel.

Munkánk során genomi Southern hibridizációval kimutattuk, hogy a *DS2*-vel erősen homológ gén jelen van *Solanum tuberosum*-ban, a termesztett burgonyában, egy gumótlan vad burgonya fajban, *Solanum brevidens*-ben, valamint paradicsomban (*Lycopesicum esculentum*) is. *Nicotiana benthamiana*-ban azonban csak nagyon gyenge kereszt hibridizációt detektáltunk a *S. chacoense* eredetű cDNS-sel.

A *DS2* funkciójának vizsgálata céljából transzgénikus burgonya növényeket hoztunk létre, amelyek a *DS2* gént vagy *35S* promoter hatására konstitutív módon expresszálják, vagy annak expressziója bennük antiszensz RNS-sel gátolt. A transzgénikus vonalak stressz-toleranciájára azonban a *DS2* gén expressziós szintje nem volt befolyással, ami feltehetőleg a különböző stresszfehérjék nagy mértékű redundanciájának következménye. A *DS2* tényleges funkciója tehát továbbra is ismeretlen.

A *S. chacoense*-ben tapasztalt ABA-független *DS2* expresszió meglehetősen kivételes jelenségnek számít a stresszgének körében, ezért a *DS2* gén expresszióját részletesebben is megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a *DS2* gén a termeszett burgonyában és paradicsomban is ABA-függetlenül szárazság-indukálható. Továbbá, hogy a *DS2* expresszió vízhiány-specifikus, mivel nem volt indukálható só, hideg, hő, hypoxia és oxidatív stresszek által sem. A *DS2* szabályozása azonban *de novo* fehérje faktorokat igényel, mivel ciklohéximid kezeléssel gátolható a gén expressziója. A *S. tuberosum*-ból készített genomi klóntárból egy 1140 bp hosszúságú feltételezett promoter szekvenciát izoláltunk. A promoter 1140 és 498 bp szakaszait β-glükuronidáz (*GUS*) riporter génnel fúzionáltattuk, és aktivitásukat transzgénikus burgonya növényekben, valamint tranziens esszével *N. benthamiana*-ban teszteltük. Hisztokémiai festéssel és enzimaktivitás méréssel megállapítottuk, hogy a 498 bp promoter szakasz képes vízvesztés hatására GUS aktivitást indukálni minkét vizsgált fajban. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a vízhiány-specifikus *cisz*-elemek megtalálhatóak a vizsgált DNS szakaszban, és valószínűsítik, hogy a *DS2* szabályozásában részt vevő *transz*-faktorok jól konzerváltak a *Solanaceae* családban.

Eredményeink alapján a *DS2* promoter biotechnológiai szempontból hasznosnak bizonyulhat stressz-toleráns haszonnövények kialakításában. Az ABA-tól és hidegtől is független vízhiány szignál transzdukciós mechanizmusokról jelenlegi ismereteink nagyon

hiányosak. Ezért a promoter gyakorlati alkalmazásának lehetősége mellett, a *DS2*-t szabályozó *cisz*- és *transz*-elemek tanulmányozása hozzásegíthet a vízhiány-specifikus génreguláció jobb megértéséhez.

SUMMARY

Environmental stresses induce the expression of several plant genes via multiple and cross-talking signalling pathways. Previously, it was shown that *DS2*, a gene of the wild potato species, *Solanum chacoense*, is highly inducible by dehydration but not by abscisic acid (ABA), the mediator of many plant stress responses. In our studies genomic Southern hybridisations revealed that *DS2*-related genes are present in the cultivated potato, *Solanum tuberosum*, in the non-tuberising *Solanum* species, *Solanum brevidens* and also in the related species, tomato (*Lycopesicum esculentum*). However, only very weak cross-hibridisation was detected in the wild tobacco species, *Nicotiana benthamiana*.

In order to investigate the function of *DS2* transgenic potato lines were produced in which *DS2* was either overexpressed or blocked by antisense RNA. However, drought adaptation of these lines was not affected by modification of *DS2* expression level. This might be a consequence of great redundancy of stress-related proteins. Thus the function of *DS2* remains obscure.

The rather unique ABA-independent expression of *DS2* in *S. chacoense* prompted further analysis of the expression pattern of this gene. We found that *DS2* is also ABA-independently drought-inducible in the cultivated potato and tomato. Moreover, *DS2* expression is dehydration-specific since it is not inducible by cold, heat, salt, hypoxia or oxidative stresses. Signalling of *DS2* induction, however, is dependent

on the synthesis of novel proteins since cycloheximide can block *DS2* expression. A genomic library was established from *S. tuberosum* and an 1140-bp region of the *DS2* promoter was isolated and analysed at DNA sequence level. Promoter regions of 1140 and 498 bp were fused to the β-glucuronidase (*GUS*) reporter gene and tested for activity in transgenic potato plants, and also, by a transient assay in another solanaceous species, *N. benthamiana*. Based on histochemical staining and enzyme activity measurements the 498-bp promoter fragment was able to induce GUS activity in response to dehydration in both species tested. These results indicate that drought-specific *cis*-elements are located within 498-bp upstream to the *DS2* coding sequence and suggest that the *trans*-factors for *DS2* expression are well conserved in solanaceous species. Based on these findings *DS2* promoter might be useful for engineering stress tolerant crops. Furthermore, drought induced signalling that is independent from signalling cascades of ABA and cold is poorly understood. Dissection of *cis*- and *trans*-regulatory elements of *DS2* signalling can facilitate understanding of dehydration specific gene regulation.

MELLÉKLETEK

M1. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Szakcikkek lektorált folyóiratokban:

DÓCZI R., CSANAKI C., BÁNFALVI Z. (2002): Expression and promoter activity of the dessication-specific *Solanum tuberosum* gene, *StDS2*. *Plant, Cell & Environment* 25, 1197-1203. p. IF 2001: 3,3

DÓCZI R., KONDRÁK M., BÁNFALVI Z.: Analysis of the dessication-specific gene, *DS2*, in *Lycopersicum esculentum* and *Nicotiana benthamiana*. (készülő kézirat)

Szakcikkek lektorált kiadványokban:

JENES B., TOLDI O., BÁNFALVI Z., DÓCZI R., OREIFIG A., DALLMANN G. (2000): Improvement of tolerance against dehydration stress in cereals. *In:* Use of Agriculturally Important Genes in Agricultural Biotechnology, NATO Science Series, Vol. 319, G. Hrazdina (ed.) pp 7-13

BÁNFALVI Z.., MOLNÁR A., LOVAS Á., DÓCZI R., LAKATOS L., HUTVÁGNER G. (2000): Potato transformations. *In:* Use of Agriculturally Important Genes in Agricultural Biotechnology, NATO Science Series, Vol. 319, G. Hrazdina (ed.) pp 107-111

Szabadalmi bejelentések:

BÁNFALVI ZS., SZTANKÓ X., HUTVÁGNER GY., LAKATOS L., MOLNÁR A., DÓCZI R. (2002): Burgonya transzformációs módszer transzgénikus burgonya fajták előállítására. Magyar szabadalom, NSZO-jelzete: C12N 15/82

BÁNFALVI ZS., DÓCZI R., CSANAKI CS., KONDRÁK M., SILHAVY D. (2001): A *DS2* gén szárazság-specifikus expressziót biztosító promoter szakasza. P0103697 és P0200379 ügyszámú szabadalmi bejelntések a Magyar Szabadalmi Hivatalhoz, PCT bejelentés első fázis

Konferencia-kiadványok (angol nyelvű):

DÓCZI R., CSANAKI C., KONDRÁK M., BÁNFALVI Z. (2001): Expression and promoter activity studies on the dessication-specific *DS2* gene in solanaceous species. 4th International Symposium on Recent Advances in Plant Biotechnology, Trebon, Czeh Republic, September 17-21, Abstract p.111

BÁNFALVI Z., MOLNÁR A., LOVAS Á., DÓCZI R., LAKATOS L., HUTVÁGNER, G. (1999): Potato transformations. Use of Agriculturally Important Genes in Agricultural Biotechnology, NATO Advanced Research Workshop, Szeged, October 17-21, Abstract p. 3

BÁNFALVI Z., DÓCZI R., OREIFIG A., TOLDI O., JENES B. (1999): Expression of water-stress-inducible genes in potato. Japanese-Hungarian Binational Symposium on “Developmental and environmental control of cell differentiation”, Szeged, October 14-15, Abstract p. 29.

DÓCZI R., SILHAVY D., OREIFIG A., TOLDI O., JENES B., BÁNFALVI Z. (1999): Genetic analysis of the ABA.independent drought-inducible gene, DS2. Hungarian-Israeli Conference on Plants and Environmental Stress, Szeged, May 10-12, Abstract p. 16

BÁNFALVI Z., SILHAVY D., HUTVÁGNER G., DÓCZI R. (1996): Engeneering for insect and stress resistant crops. The 2nd Brazilian-Hungarian Seminar and Training Course in Plant Biotechnology, Budapest, August-September. Proceedings p. 21-25

HUTVÁGNER G., DÓCZI R., BÁNFALVI Z. (1995): PCR-based cloning of a cytochrome P-450 cDNA from *Solanum chacoense* Bitter. 4th International Symposium on the Molecular Biology of the Potato, Wageningen, July 17-20. Abstracts p. 91

Konferencia-kiadványok (magyar nyelvű):

DÓCZI R., OREIFIG A., TOLDI O., CSANAKI CS., BÁNFALVI ZS. (2000): Egy új típusú szárazság-indukálta gén, a *DS2*, szabályozásának vizsgálata. A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 5. Munkaértekezlete, Sopron, május 8-11, Összefoglaló 29. old.

OREIFIG A., DÓCZI R., TOLDI O., KOVÁCS G., JENES B., BÁNFALVI ZS. (1999): A burgonya szárazságindukálható DS2 promóterének aktivitás-vizsgálata egyszikű gabonafélék sejttenyészeteiben. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, április 11-14. Összefoglaló 137. old.

DÓCZI R., BÁNFALVI ZS. (1998): Egy új típusú szárazság indukálta gén, a *DS2*, szabályozásának és funkciójának vizsgálatára alkalmas vektor konstrukciók létrehozása. IV. Növénynemesítési Tudományos Napok, Budapest, január 28-29. Összefoglaló 78. old.

M2. IDÉZETT IRODALMAK JEGYZÉKE

ABE H., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., URAO T., IWASAKI T., HOSIKAWA D., SHINOZAKI K. (1997): Role of Arabidopsis Myc and Myb homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 25, 1859-1868. p.

ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*,. 25 (17) 3389-3402. p.

AMITAI-ZEIGERSON H., SCOLNIK P.A., BAR-ZVI D. (1994): Genomic nucleotide sequence of tomato Asr2, a second member of the stress/ripening-induced Asr1 gene family. *Plant Physiology*, 106, 169-170. p.

BARTELS D., SCHNEIDER K., TERSTAPPEN G., PIATKOWSKI D., SALAMINI F., (1990): Molecular cloning of ABA-modulated genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* which are induced during desiccation. *Planta*, 181, 27-34. p.

BEGG J.E., TURNER N.C. (1976): Crop water deficits. *Advances in Agronomy* 28, 161-217. p.

BIANCHI G., GAMBA A., MURELLI C., SALAMINI F., BARTELS D. (1991): Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. *Plant Journal*, 25, 355-359. p.

BOHNERT H.J., NELSON D.E., JENSEN R.G. (1995): Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 25, 1099-1111. p.

BONETTA D., MCCOURT P. (1998): Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science*, 3, 231-235. p.

BÖGRE L., MESKIENE I., HEBERLE-BORS E., HIRT H. (2000): Stressing the role of MAP kinases in mitogenic stimulation. *Plant Molecular Biology*, 43 (5-6) 705-718. p.

BRADFORD M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. p.

BRAY E.A. (1997): Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sciences*, 2, 48-54. p.

BRAY E.A. (1993): Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103, 1035-1040. p.

BROWNE J., TUNNACLIFFE A., BURNELL A. (2002): Anhydrobiosis: plant desiccation gene found in a nematode. *Nature*, 416 (6876) 38. p.

BURTON W.G. (1981): Challenges for stress physiology in potato. *American Potato Journal*, 58, 3-14. p.

BUSK P.K., PAGES M. (1998): Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology*, 37 (3) 425-435. p.

CANEL C., BAILEY-SERRES J.N., ROOSE M.L. (1995): Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiology*, 108, 1323-1324. p.

CARPENTER J.F., CROWE L.M., ARAKAWA T. (1990): Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *Journal of Dairy Science*, 73, 3627-3636. p.

CHANDLER J., BARTELS D. (1999): Plant desiccation. 575-590. p. In: LERNER H.R. (Ed.) *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization*. Marcel Dekker

CHANG S., PURYEAR J.D., DIAS M.A.D.L., FUNKHOUSER E.A., NEWTON R.J. CAIRNEY J. (1995): Gene expression under water deficit in loblolly pine (Pinus taeda L.): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum*, 95, 1-10. p.

CHOI H., HONG J., HA J., KANG J., KIM S. (2000): ABFs: a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry*, 25, 1723-1730. p.

CHURCH G.M., GILBERT W. (1984): Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81, 1991-1995. p.

CLOSE T.J, LAMMERS P.J. (1993): An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiology*, 101 (3) 773-779. p.

COLACO C., SEN S., THANGAVELU M., PINDER S., ROSER B. (1992): Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (N Y)*, 10 (9) 1007-1011. p.

CROWE J.H., HOEKSTRA F.A., CROWE L.M. (1992): Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54, 579-599. p.

CUSHMAN J.C., BOHNERT H.J. (2000): Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (2) 117-124. p.

DEBLAERE, R., BYTEBIER, B., DE GREVE, H., DEBROEK, F., SCHELL, J., VAN MONTAGU, M., LEEMANS, J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors of *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, 13, 4777-4788. p.

DEJARDIN A., SOKOLOV L.N., KLECZKOWSKI L.A. (1999): Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid- independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in Arabidopsis. *Biochemical Journal*, 25, 503-509. p.

DEMAGANTE A.L., VAN DER ZAAG P. (1988) The response of potato (Solanum spp.) to photoperiod and light intensity under high temperatures. *Potato Research* 31, 73-83. p.

DIETZE J., BLAU A., WILLMITZER L. (1995): *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum).* 24-29. p. In: POTRYKUS I., SPANGENBERG G. (Eds.) *Gene Transfer to Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 361 p.

DITTA G.S., STANFIELD D., CORBIN D., HELINSKI D.R. (1980): Broad host-range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of Rhizobium meliloti *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77, 7347-7351. p.

FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132 (1) 6-13. p.

FIGURSKI D.H., HELINSKI D.R. (1979): Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 76, 1648-1652. p.

FINKELSTEIN R.R., LYNCH T.J. (2000): The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12, 599-609. p.

FINKELSTEIN R.R., WANG M.L., LYNCH T.J., RAO S., GOODMAN H.M. (1998): The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell*, 10, 1043- 1054. p.

FRANK W., PHILLIPS J., SALAMINI F., BARTELS D. (1998): Two dehydration inducible transcripts from the resurrection plant Craterostigma plantagineum encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant Journal*, 25, 413-421. p.

GILAD A., AMITAI-ZEIGERSON H., SCOLNIK P.A., BAR-ZVI D. (1997) *Asr1*, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. *Acta Horticulturae*, 447, 447-453. p.

GARAY-ARROYO A., COLMENERO-FLORES J.M., GARCIARRUBIO A., COVARRUBIAS A.A. (2000): Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (8) 5668-5674. p.

GAZZARRINI S., MCCOURT P. (2001): Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 4 (5) 387-391. p.

GEIGENBERGER P., REIMHOLZ R., DEITING U., SONNEWALD U., STITT M. (1999): Decreased expression of sucrose phosphate synthase strongly inhibits the water stress-induced synthesis of sucrose in growing potato tubers. *Plant Journal*, 19 (2) 119-129. p.

GILAD A., AMITAI-ZEIGERSON A., SCOLNIK P.A., BAR-ZVI D. (1997): ASR1, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DAN-binding activity. *Acta Horticulturae*, 447, 447-453. p.

GOMEZ-CADENAS A., VERHEY S.D., HOLAPPA L.D., SHEN Q., HO T.H. (1999): An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96 (4) 1767-1772. p.

GOSTI F., BEAUDOIN N., SERIZET C., WEBB A.A., VARTANIAN N., GIRAUDAT J. (1999): ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 11 (10) 1897-1910. p.

GRILL E, HIMMELBACH A. (1998): ABA signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(5):412-418. p.

GUILTINAN M.J., MARCOTTE W.R. & QUATRANO R.S. (1990): A plant leucine zipper protein recognizes an abscisic acid responsive element. *Science*, 25, 267-271. p.

HANAHAN D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166 (4) 557-580. p.

HARMON A.C., GRIBSKOV M., HARPER J.F. (2000): CDPKs - a kinase for every Ca2+ signal? *Trends in Plant Science*, 5 (4) 154-159. p.

HAVERKORT A.J., VAN DE WAART M., BODLAENDER K.B.A. (1990): The effect of early drought stress on numbers of tubers and stolons of potato in controlled and field conditions. *Potato Research*, 33, 89-96. p.

HEO W.D., LEE S.H., KIM M.C., KIM J.C., CHUNG W.S., CHUN H.J., LEE K.J., PARK C.Y., PARK H.C., CHOI J.Y., CHO M.J. (1999): Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96 (2) 766-771. p.

HETHERINGTON A.M. (2001): Guard cell signaling. *Cell*, 107 (6) 711-714. p.

HETHERINGTON A.M. (1999): Abscisic acid. *Current Biology*, 9 (11) R390. p.

HEY S.J., BACON A., BURNETT E., NEIL S.J. (1997): Abscisic acid signal transduction in epidermal cells of *Pisum sativum* L. *Argentum*: both dehydrin mRNA accumulation and stomatal responses require protein phosporilation and dephosporilation. *Planta*, 202, 85-92. p.

HIGO K., UGAWA Y., IWAMOTO M., KORENAGA T. (1999): Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, 27, 297-300. p.

HOEKSTRA F.A., GOLOVINA E.A., BUITINK J. (2001): Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Science*, 6 (9) 431-438. p.

HOLMSTRÖM K., MANTYLA E., WELIN B., MANDAL A., PALVA E.T. (1996): Drought tolerance in tobacco. *Nature*, 379, 683-684. p.

HOYOS ME, ZHANG S. (2000): Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiology*, 122 (4) 1355-1363. p.

HSIAO T.C. (1973): Plant response to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 519-570. p.

HUANG J.C., LIN S.M., WANG C.S. (2000): A pollen-specific and desiccation-associated transcript in Lilium longiflorum during development and stress. *Plant and Cell Physiology*, 41, 477-485. p.

ICHIMURA K., MIZOGUCHI T., YOSHIDA R., YUASA T., SHINOZAKI K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal*, 24 (5) 655-665. p.

INGRAM J., BARTELS D. (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377-403. p.

INGRAM J., CHANDLER J., GALLAGHER L., SALAMINI F., BARTELS D. (1997): Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant Craterostigma plantagineum Hochst. *Plant Physiology*, 25, 113-121. p.

INOUE H., NOJIMA H., OKAYAMA H. (1990): High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, 96 (1) 23-28. p.

ITAI A., TANABE K., TAMURA F. TANAKA T. (2000): Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (Pyrus pyrifolia Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1163-1166. p.

ITURRIGA G., LEYNS L., VILLEGAS A., GHARABEIH R., SALAMINI F., BARTELS D. (1996): A family of novel myb-related genes from the resurrection plant Craterostigma plantagineum are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Molecular Biology*, 25, 707-716. p.

IUSEM N.D., BARTHOLOMEW D.M., HITZ W.D., SCOLNIK P.A. (1993): Tomato (Lycopersicon esculentum) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiology*, 102, 1353-1354. p.

IWASAKI T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1995): Identification of a *cis*-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Molecular and General Genetics*, 247, 391-398. p.

JAGLO-OTTOSEN K.R., GILMOUR S.J., ZARKA D.G., SCHABENBERGER O., THOMASHOW M.F. (1998): Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280 (5360), 104-106. p.

JEFFERSON R.A. (1987): Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5, 387-405. p.

JENKINS G.I. (1998): Signal transduction networks and the integration of responses to environmental stimuli. *Advances in Botanical Research*, 29, 55-75. p.

KAPILA J., DE RYCKE R., VAN MONTAGU M., ANGENON G. (1997): An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122, 101-108. p.

KASUGA M., LIU Q., MIURA S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1999): Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 25, 287-291. p.

KAVI KISHOR P.B., HONG Z., MIAO G.H., HU C.-A.A., VERMA D.P.S. (1995): Overexpression of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108, 1387 1394. p.

KIEGERL S., CARDINALE F., SILIGAN C., GROSS A., BAUDOUIN E., LIWOSZ A., EKLOF S., TILL S., BÖGRE L., HIRT H., MESKIENE I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell*, 12 (11) 2247-2258. p.

KIYOSUE T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1993).: Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLP A, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 196, 1214-1220. p.

KLEINES M., ELSTER R.C., RODRIGO M.J., BLERVACQ A.-S., SALAMINI F., BARTELS D. (1999): Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose synthase genes from the Craterostigma plantagineum (Hochst.). *Planta*, 25, 13-24. p.

KNIGHT H, KNIGHT MR. (2001): Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, 6 (6) 262-267. p.

KOIZUMI M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., TSUJI H. & SHINOZAKI K. (1993): Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 30, 175-182. p.

KOORNNEEF M., REULING G., KARSSEN C.M. (1984): The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Physiolgica Plantarum*, 61, 377-383. p.

KUO A., CAPPELLUTI S., CERVANTES-CERVANTES M., RODRIGUEZ M., BUSH D.S. (1996): Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *Plant Cell*, 8 (2) 259-69. p.

LEE Y.-H., CHUN J.-Y. (1998): A new homeodomain-leucine zipper gene from Arabidopsis thaliana induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Molecular Biology*, 25, 377-384. p.

LEUNG J., BOUVIER-DURAND M., MORRIS P.-C., GUERRIER D., CHEFDOR F., GIRAUDAT J. (1994): Arabidopsis ABA-response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264, 1448-1452. p.

LEUNG J., GIRAUDAT J. (1998): Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 199-222. p.

LEUNG J., MERLOT S., GIRAUDAT J. (1997): The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*, 9, 759-771. p.

LI J., WANG X.Q., WATSON M.B., ASSMANN S.M. (2000): Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, 287 (5451) 300-303. p.

LIU Q., KASUGA M., SAKUMA Y., ABE H., MIURA S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. (1998): Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25, 1391-1406. p.

LIU Y., ZHANG S., KLESSIG D.F. (2000): Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase kinase that interacts with SIPK. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13 (1) 118-124. p.

LOGEMANN J., SCHELL J., WILLMITZER, L. (1987): Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 163, 16-20. p.

MACKERRON D.K.L., JEFFERIES R.A. (1988a): The distributions of tuber sizes in droughted and irrigated crops of potato. I. Observations on the effect of water stress on graded yields from differing cultivars. *Potato Research*, 31, 269-278. p.

MACKERRON D.K.L., MARSHALL B., JEFFERIES R.A. (1988b): The distributions of tuber sizes in droughted and irrigated crops of potato. II. Relation between size and weight of tubers and the variability of tuber-size distributions. *Potato Research*, 31, 279-288. p.

MAEDA T., TAKEKAWA M., SAITO H. (1995): Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 25, 554-558. p.

MARIAUX J.-B., BOCKEL C., SALAMINI F., BARTELS D. (1998): Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the

resurrection plant Craterostigma plantagineum. *Plant Molecular Biology*, 25, 1089-1099. p.

MAUREL C., CHRISPEELS M.J. (2001): Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, 25, 135-138.

MBEGUIE-A-MBEGUIE D., GOMEZ R.M., FILS-LYCAON B. (1997): Molecular cloning and nucleotide sequence of an abscisic acid-, stress-, ripening-induced (ASR) -like protein from apricot fruit (Accession No. U93164). Gene expression during fruit ripening. (PGR97-166). *Plant Physiology*, 115, 1288. p.

MCKERSIE B.D., BOWLEY S.R., HARJANTO E., LEPRINCE O. (1996): Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpression superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 111, 1177-1181. p.

MEISSNER R.C., JIN H., COMINELLI E., BEVAN M. (1999): Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell*, 25, 1827-1840. p.

MERLOT S, GOSTI F, GUERRIER D, VAVASSEUR A, GIRAUDAT J. (2001): The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant Journal*, 25 (3) 295-303. p.

MEYER K., LEUBE, M.P., GRILL E. (1994): A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. *Science*, 264, 1452-1455. p.

MIKOLAJCZYK M, AWOTUNDE OS, MUSZYNSKA G, KLESSIG DF, DOBROWOLSKA G. (2000): Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell*, 12 (1) 165-178. p.

MIZUNO T. (1998): His-Asp phosphotransfer signal transduction. *Journal of Biochemistry*, 25, 555-563. p.

MUNNIK T, LIGTERINK W, MESKIENE I I, CALDERINI O, BEYERLY J, MUSGRAVE A, HIRT H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *The Plant Journal*, 20 (4) 381-388. p.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. p.

NAKAGAWA H., OHMIYA K., HATTORI T. (1996): A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant Journal*, 25, 217-227. p.

NAKASHIMA K., KIYOSUE T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. (1997): A nuclear gene, *erd1*, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 12, 851-856. p.

NANJO T., KOBAYASHI M., YOSHIBA Y., SANADA Y., WADA K., TSUKAYA H., KAKUBARI Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1999): Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 18 (2) 185-93. p.

NANTEL A., QUATRANO R.S. (1996): Characterization of three basic leucine zipper factors, including two inhibitors of EmBP-1 DNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry*, 25, 31296-31305. p.

OEDA K., SALINAS J., CHUA N.-H. (1991): A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box like motif conserved in plant genes. *The EMBO Journal*, 25, 1793-1802. p.

OHTA I.M., VARSHAVSKY A. (1993): A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, 25, 566-569. p.

PADMANABHAN V., DIAS D.M., NEWTON R.J. (1997): Expression analysis of a gene family in loblolly pine (Pinus taeda L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology*, 35, 801-807. p.

PALKOVICS L., WITTNER A., BALÁZS E. (1995): Pathogen-derived resistance induced by integrating the plum pox virus coat protein gene into plants of *nicotiana benthamiana*. Acta Horticulturae 386, 311-317. p.

PAPAGEORGIOU G.C., MURATA N. (1995): The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynthesis Research*, 25, 243-252. p.

PEARSON W.R, LIPMAN D.J. (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, (8) 2444-2448. p.

PEI Z.M., KUCHITSU K., WARD J.M., SCHWARZ M., SCHROEDER J.I.. (1997): Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and abi1 and abi2 mutants. *Plant Cell*, (3) 409-423. p.

PELAH D., WANG W., ALTMAN A., SHOSEYOV O., BARTELS D. (1997): Differential accumulation of water-stress related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in Populus species that differ in their water stress response. *Physiologia Plantarum*, 25, 153-159. p.

PERL-TREVES R.,GALUN E. (1991): The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology*, 17, 745-760. p.

PHILLIPS J, ARTSAENKO O, FIEDLER U, HORSTMANN C, MOCK HP, MUNTZ K, CONRAD U. (1997): Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO Journal*, 16 (15) 4489-4496. p.

RODRIGUEZ P.L., BENNING G., GRILL E. (1998): ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *FEBS Letters*, 421, 185-190. p.

ROMBAUTS S., DÉHAIS P., VAN MONTAGU M., ROUZÉ P. (1999): PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Research*, 27, 295-296. p.

ROSSI M., CARRARI F., CABRERA-PONCE J.L., VAZQUEZ-ROVERE C., HERRERA-ESTRELLA L., GUDESBLAT G., IUSEM N.D. (1998): Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Molecular and General Genetics*, 258, 1-8. p.

ROXAS V.P., SMITH R.K. JR, ALLEN E.R., ALLEN R.D. (1997): Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, 15 (10) 988-991. p.

SAKAMOTO A., MURATA N. (2001): The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiology*, 125 (1) 180-188. p.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANDERS D., BROWNLEE C., HARPER J.F. (1999): Communicating with calcium. *Plant Cell*, 11 (4) 691-706. p.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R.. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74 (12) 5463-5467. p.

SANTORO M.M., LIU Y., KHAN S.M.A., HOU L.X., BOLEN D.W. (1992): Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*, 25, 5278-5283. p.

SCHMIDT C, SCHELLE I, LIAO YJ, SCHROEDER JI. (1995): Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells byphosphorylation and dephosphorylation events. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92 (21) 9535-9539. p.

SCHNEIDER A., SALAMINI F., GEBHARDT C. (1997): Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene ci21A of potato. *Plant Physiology*, 113, 335-345. p.

SEKI M., NARUSAKA M., ABE H., KASUGA M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., CARNINCI P., HAYASHIZAKI Y., SHINOZAKI K. (2001): Monitoring the expression pattern of Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 25, 61-72. p.

SEO M, KOSHIBA T. (2002): Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7 (1) 41-48. p.

SHEEN J. (1996): Ca2+-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science*, 274 (5294) 1900-1902. p.

SHEN B, JENSEN RG, BOHNERT HJ. (1997): Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 113 (4) 1177-1183. p.

SHEVELEVA E., CHMARA W., BOHNERT H.J., JENSEN R.G. (1997): Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic Nicotiana tabacum L. *Plant Physiology*, 115, 1211-1219. p.

SHEVELEVA E.V., MARQUEZ S., CHMARA W., ZEGEER A., JENSEN R.G., BOHNERT H.J. (1998): Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco. High amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiology*, 117 (3) 831-839. p.

SHIMSI D., SUSNOSCHI M. (1985): Growth and yield studies of potato development in a semi-arid region. 3. Effect of water stress and amounts of nitrogen top dressing on physiological indices and on tuber yield and quality of several cultivars. *Potato Research*, 28, 177-191. p.

SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2000): Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk betweentwo stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3) 217-223. p.

SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (1997): Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115, 327-334. p.

SHURE M., WESSLER S., FEDOROFF N. (1983): Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus of maize. *Cell*, 35, 225-233. p.

SIDDIQUI N.U., CHUNG H.J., THOMAS T.L., DREW M.C. (1998): Abscisic acid-dependent and -independent expression of the carrot late-embryogenesis-abundant-class gene Dc3 in transgenic tobacco seedlings. *Plant Physiology*, 118, 1181-1190. p.

SILHAVY D., HUTVÁGNER G., BARTA E., BÁNFALVI Z. (1995): Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from Solanum chacoense. *Plant Molecular Biology*, 27, 587-595. p.

SÖDERMAN E., HJELLSTRÖM M., FAHLESON J., ENGSTRÖM P. (1999): The HD-Zipgene ATHB6 in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots andcarpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Molecular Biology*, 25, 1073-1083. p.

SÖDERMAN E., MATTSSON J., ENGSTRÖM P. (1996): The Arabidopsis homeobox gene ATHB-7 is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant Journal*, 25, 375-381. p.

STIEKEMA W.J., HEIDEKAMP F., DIRKSE W.G., VAN BECKUM J., DE HAAN P., TEN BOSH C., LOUWERSE, J.D. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology*, 11, 255-269. p.

STOCKINGER E.J., GILMOUR S.J., THOMASHOW M.F. (1997): Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 25, 1035-1040. p.

TABAEIZADEH Z. (1998): Drought-induced responses in plant cells. *International Review of Cytology*, 182, 193-247. p.

TAO R., URATSU S.L., DANDEKAR A.M. (1995): Sorbitol synthesis in transgenic tobacco with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Cell Physiology*, 366, 525-532. p.

TARCZYNSKI M.C., JENSEN R.G., BOHNERT H.J. (1993): Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 259, 508-510. p.

UNO Y., FURIHATA T., ABE H., YOSHIDA R., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2000): Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 25, 11632-11637. p.

URAO T., YAKUBOV B., SATOH R., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SEKI M., HIRAYAMA T. & SHINOZAKI K. (1999): A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 25, 1743-1754. p.

URAO T., MIYATA S., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (2000a): Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. *FEBS Letters*, 25, 227-232. p.

URAO T., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. & SHINOZAKI K. (2000b) Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in Plant Science*, 25, 67-74. p.

XU D., DUAN X., WANG B., HONG D., HO T.H.D., WU R. (1996): Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 25, 249-257. p.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., KOIZUMI M., URAO S., SHINOZAKI K. (1992): Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in Arabidopsis thaliana: sequence analysis of one clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiology*, 25, 217-224. p.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1993): The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics*, 25, 17-25. p.

YANCEY P.H., CLARK M.E., HAND S.C., BOWLUS R.D., SOMERO G.N. (1982): Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 25, 1214-1222. p.

YANISCH-PERRON C., VIEIRA J., MESSING J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33 (1) 103-119. p.

YOSHIBA Y., KIYOSUE T., NAKASHIMA K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., SHINOZAKI K. (1997): Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiology*, 38 (10) 1095-1102. p.

VAN BERKEL J., SALAMINI F., GEBHARDT C. (1994): Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiology*, 104, 445-452. p.

VAN LOON C.D. (1981): The effect of water stress on potato growth, development, and yield. *American Potato Journal* 58, 51-69. p.

VAYDA M.E. (1994): Environmental stress and ist impact on potato yield. 239. p. In: BRADSHAW J.E., MACKAY G.R. (Szerk.): *Potato genetics*. Wallingford: CAB International, 552 p.

WU Y., KUZMA J., MARECHAL E., GRAEFF R., LEE H.C., FOSTER R, CHUA N.H.. (1997): Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science*, 278 (5346) 2126-2130. p.

WURGLER-MURPHY S.M., SAITO H. (1997): Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 172-176. p.

ZHANG J.H., DAVIES W.J. (1987): ABA in roots and leaves of flooded pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 38, 649-659. p.

ZHU J.K. (2001): Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, 4 (5) 401-406. p.

M3. A *Solanum tuberosum DS2* promoter és gén (*StDS2*) elsődleges szerkezete

```
     GAATTCGCGCTCCTGCCCCTGAGGTCGCGTGTTCGAATCCAAAGAGAGGCAATTTTTTTT
   1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
     CTTAAGCGCGAGGACGGGGACTCCAGCGCACAAGCTTAGGTTTCTCTCCGTTAAAAAAAA

     CTCAGCTTATATTTTAGGCGGGAATTTAAGATTTAGTAGTTTAATCCCTAATTATAAAAT
  61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
     GAGTCGAATATAAAATCCGCCCTTAAATTCTAAATCATCAAATTAGGGATTAATATTTTA

     GAAATATTAAAAAGCCCTTTTATTCTTTTTTAAAACCCTGATAATCCCTAATTACAAAGT
 121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
     CTTTATAATTTTTCGGGAAAATAAGAAAAAATTTTGGGACTATTAGGGATTAATGTTTCA

     CAAATATTAAAATACCCTTTTCCTCTTTTAGGATTTTTTCACGTTTTATTTTTTTCATTG
 181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
     GTTTATAATTTTATGGGAAAAGGAGAAAATCCTAAAAAAGTGCAAAATAAAAAAAGTAAC

     CTCTTCTTCGTTCTTCCTTGCTCTGGCTGCTGCTTGTTGTTGGCTGCTGCTTGTGCCTTG
 241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
     GAGAAGAAGCAAGAAGGAACGAGACCGACGACGAACAACAACCGACGACGAACACGGAAC

     TTGCTGCTGGCTGCTCGCCTGCTCCAGTGCCTTGTTGCTGCTGGCTGCTCGCCTGCTCCA
 301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 360
     AACGACGACCGACGAGCGGACGAGGTCACGGAACAACGACGACCGACGAGCGGACGAGGT

     GTGCTCTTTGTCACTGACTCACTGCTGCTGCCTGCTTGCTGCTATTGTTTCTTTCATCTC
 361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 420
     CACGAGAAACAGTGACTGAGTGACGACGACGGACGAACGACGATAACAAAGAAAGTAGAG

     CATTAATAACTACTTGGGTATGTTTTTGGTTCCCCTTTTTCTTACTAGATTTCTATATAC
 421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 480
     GTAATTATTGATGAACCCATACAAAAACCAAGGGGAAAAAGAATGATCTAAAGATATATG

     CTTATTTCGTTATTTCTTGATGTGCTTTCTTTTAGTTGGCTGAATTATTGATATCATTGA
 481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 540
     GAATAAAGCAATAAAGAACTACACGAAAGAAAATCAACCGACTTAATAACTATAGTAACT

     AGTTTCAATTTTTTGTTTGGCTAATTTAATATATTTTCTTAATCTAAAATTAGAGAGATA
 541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
     TCAAAGTTAAAAAACAAACCGATTAAATTATATAAAAGAATTAGATTTTAATCTCTCTAT

     GAGAAATATAATGTAATAATCAAATAACCATTGCTTAAGCTTCTTTTTGGTTTTGGCCCT
 601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660
     CTCTTTATATTACATTATTAGTTTATTGGTAACGAATTCGAAGAAAAACCAAAACCGGGA

     TTTTGATTTTGGTCCTTATTTAATAGTTCTGACTTCTGAATGTGTGCTTATTTCTCTTAA
 661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 720
     AAAACTAAAACCAGGAATAAATTATCAAGACTGAAGACTTACACACGAATAAAGAGAATT
```

```
     ATTCTAACTAAACTTTTACTTTACAATCCAGTCTTAAATCTTAATATTCAATGAAGAAGT
 721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 780
     TAAGATTGATTTGAAAATGAAATGTTAGGTCAGAATTTAGAATTATAAGTTACTTCTTCA

     ATTTTACCCCAATATCGAAATCAAGTTTAGCCTCTCATAGTCATAGTCAATCTAACCAAG
 781 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 840
     TAAAATGGGGTTATAGCTTTAGTTCAAATCGGAGAGTATCAGTATCAGTTAGATTGGTTC

     AAGAAAATGTCAATCATTCTGAAGTACCATCACATTCTTCTCAAGAATTTGATTTGAGTA
 841 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 900
     TTCTTTTACAGTTAGTAAGACTTCATGGTAGTGTAAGAAGAGTTCTTAAACTAAACTCAT

     CTTTAAAGTTTGATCCCGGTGAAAGAACTCCAATATTGAAATTATTTTTTTTGAACCCCC
 901 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 960
     GAAATTTCAAACTAGGGCCACTTTCTTGAGGTTATAACTTTAATAAAAAAAACTTGGGGG

     TTGATTAAAATCCTCCCTCCGCCACTGCACGTTCATTGGACAAACTAATTAATTAGTCCC
 961 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1020
     AACTAATTTTAGGAGGGAGGCGGTGACGTGCAAGTAACCTGTTTGATTAATTAATCAGGG

     CCACTTCACCTCCACTTATAAATACCACTCAATATTAACAAGAAAAAAACATCCAAAGTA
1021 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1080
     GGTGAAGTGGAGGTGAATATTTATGGTGAGTTATAATTGTTCTTTTTTTGTAGGTTTCAT

     TATATTTTGTTCTACTAATACATCATTTTTTTTCATACAAAATTATCACCAAAAAACATC
1081 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1140
     ATATAAAACAAGATGATTATGTAGTAAAAAAAAGTATGTTTTAATAGTGGTTTTTTGTAG

     ATGGCAGAACAGAAGAAACATCACTTTGGTGGTCTCTTCCACCACCACAAGAACGAGGAG
1141 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1200
     TACCGTCTTGTCTTCTTTGTAGTGAAACCACCAGAGAAGGTGGTGGTGTTCTTGCTCCTC
     M  A  E  Q  K  K  H  H  F  G  G  L  F  H  H  H  K  N  E  E   -

     GAAGACACCCCCGTTGAGAAAACTACATATGAAGAAACAACCTATGGAGAGAGTGAAAAA
1201 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1260
     CTTCTGTGGGGGCAACTCTTTTGATGTATACTTCTTTGTTGGATACCTCTCTCACTTTTT
     E  D  T  P  V  E  K  T  T  Y  E  E  T  T  Y  G  E  S  E  K   -

     ACTAGAACCTATGGTGAGAAAACTAGTTATGGTGATGATACATATGGCGAAAAAACTACC
1261 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1320
     TGATCTTGGATACCACTCTTTTGATCAATACCACTACTATGTATACCGCTTTTTTGATGG
     T  R  T  Y  G  E  K  T  S  Y  G  D  D  T  Y  G  E  K  T  T   -

     ACATTCGGAGATGACAACAAATATGGTGAGAAAACTAGTTATGGTGATGATACATATGGT
1321 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1380
     TGTAAGCCTCTACTGTTGTTTATACCACTCTTTTGATCAATACCACTACTATGTATACCA
     T  F  G  D  D  N  K  Y  G  E  K  T  S  Y  G  D  D  T  Y  G   -

     GAAAAACCTACCTCCTACGGAGGAGATAATACATATGGTGAGAAAACAAGTTATGGTGAG
1381 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1440
     CTTTTTGGATGGAGGATGCCTCCTCTATTATGTATACCACTCTTTTGTTCAATACCACTC
     E  K  P  T  S  Y  G  G  D  N  T  Y  G  E  K  T  S  Y  G  E   -
```

```
     GGAGATGACAACAAGTATGGTGAGAAAACTAGTTATGGTGAGGGAGATGACAACCAGTAT
1441 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1500
     CCTCTACTGTTGTTCATACCACTCTTTTGATCAATACCACTCCCTCTACTGTTGGTCATA
     G  D  D  N  K  Y  G  E  K  T  S  Y  G  E  G  D  D  N  Q  Y   -

     GGAGAGAAAACTAGTTATGGAGATAGCGGATACGGAGAGAAACCTAGTTATGGTGGGGGA
1501 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1560
     CCTCTCTTTTGATCAATACCTCTATCGCCTATGCCTCTCTTTGGATCAATACCACCCCCT
     G  E  K  T  S  Y  G  D  S  G  Y  G  E  K  P  S  Y  G  G  G   -

     GATGACAACAAATATGGTGAGAAAACTAGTTATGGTAATGAGGAAGGTGGCTATGGTGGA
1561 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1620
     CTACTGTTGTTTATACCACTCTTTTGATCAATACCATTACTCCTTCCACCGATACCACCT
     D  D  N  K  Y  G  E  K  T  S  Y  G  N  E  E  G  G  Y  G  G   -

     GGAGTTGGTGAGACTACTAATTATGAAGAGAATGAAAGTGAAACCAAAACTTCTGAGGAT
1621 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1680
     CCTCAACCACTCTGATGATTAATACTTCTCTTACTTTCACTTTGGTTTTGAAGACTCCTA
     G  V  G  E  T  T  N  Y  E  E  N  E  S  E  T  K  T  S  E  D   -
     TATAAGGAAGAGAAGAAACACCACAAGCATCTTGAAGAAATTGGGGGACTCGGAGCTGTT
1681 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1740
     ATATTCCTTCTCTTCTTTGTGGTGTTCGTAGAACTTCTTTAACCCCCTGAGCCTCGACAA
     Y  K  E  E  K  K  H  H  K  H  L  E  E  I  G  G  L  G  A  V   -

     GCTGCTGGTGCCTTTGCTTTGTAAATATTTTTCATACAGACTCTTTTAATTCTAACTTTC
1741 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1800
     CGACGACCACGGAAACGAAACATTTATAAAAAGTATGTCTGAGAAAATTAAGATTGAAAG
     A  A  G  A  F  A  L

     CATGTGACAAGAATGTTTAAGACTACAAGATTAAATGACATTTTGGTACATCCTACGTAT
1801 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1860
     GTACACTGTTCTTACAAATTCTGATGTTCTAATTTACTGTAAAACCATGTAGGATGCATA

     CTTTAGTTTAAGATAAAACATTCAAATGTCTTCCTTACTTTTTGAAATTCCGTATCAAGT
1861 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1920
     GAAATCAAATTCTATTTTGTAAGTTTACAGAAGGAATGAAAAACTTTAAGGCATAGTTCA

     GATTAAAACCAGACAAACAATTGAAACAGAGGGAGTAACTACGCTGCTCCATTTTTATGA
1921 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1980
     CTAATTTTGGTCTGTTTGTTAACTTTGTCTCCCTCATTGATGCGACGAGGTAAAAATACT

     TAATTTCTTCTTCCATTAATTTTTTATGGTATGGAAATTTCAGCATGAGAAGCACAAGGC
1981 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2040
     ATTAAAGAAGAAGGTAATTAAAAAATACCATACCTTTAAAGTCGTACTCTTCGTGTTCCG
                                                H  E  K  H  K  A  -

     AGAGAAAGACCCAGAGAATGCACACAAGCACAAGATAGAGGAAGGAATAGCAGCAGCTGC
2041 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2100
     TCTCTTTCTGGGTCTCTTACGTGTGTTCGTGTTCTATCTCCTTCCTTATCGTCGTCGACG
      E  K  D  P  E  N  A  H  K  H  K  I  E  E  G  I  A  A  A  A  -

     TGCAATTGGTGCTGGTGGATTTGCATTCCATGAACATCATGAGAAGAAGGAAGCAAAGGA
2101 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2160
     ACGTTAACCACGACCACCTAAACGTAAGGTACTTGTAGTACTCTTCTTCCTTCGTTTCCT
      A  I  G  A  G  G  F  A  F  H  E  H  H  E  K  K  E  A  K  E  -
```

```
     AGAAGAGGAGGAAGCTGAGGGAAAGAAGAAGCATCATTTCTTCAATTAATTCTCCTATCA
2161 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2220
     TCTTCTCCTCCTTCGACTCCCTTTCTTCTTCGTAGTAAAGAAGTTAATTAAGAGGATAGT
      E  E  E  E  A  E  G  K  K  K  H  H  F  F  N  *              -

     TAATATATATATTTACCTCTCTTTGTTGTGTGCTGATCAATCTATCCTTTATTAATACTC
2221 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2280
     ATTATATATATAAATGGAGAGAAACAACACACGACTAGTTAGATAGGAAATAATTATGAG

     AGCATGCACCTAAATAATTTGTATGTGTGTTACAGTACTCTTGTGTTTGATGTAAGCGTT
2281 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2340
     TCGTACGTGGATTTATTAAACATACACACAATGTCATGAGAACACAAACTACATTCGCAA

     ACTTGGTGAATTTGGCGTTTTAAGTCACCTACATGTTGTAGTACTTTGCATGAGTGTGAA
2341 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2400
     TGAACCACTTAAACCGCAAAATTCAGTGGATGTACAACATCATGAAACGTACTCACACTT

     TAATACTATTACGTATATTTTTTTTCTTAAAATTATTTCAATTAGCATACAAGTTGACTC
2401 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2460
     ATTATGATAATGCATATAAAAAAAAGAATTTTAATAAAGTTAATCGTATGTTCAACTGAG

     TCAAGGGATTATATGTCCGTTCGGTACAAAAGGAAAATATTAGATTTTTTTCTTCGTGTT
2461 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 2520
     AGTTCCCTAATATACAGGCAAGCCATGTTTTCCTTTTATAATCTAAAAAAAGAAGCACAA

     CT
2521 -- 2522
     GA
```

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bánfalvi Zsófiának, munkám során nyújtott folyamatos támogatásáért, mind a szakmai munka terén, mind annak hátterének biztosításában. Köszönet Dr. Silhavy Dánielnek, aki elindította a *DS2*-vel kapcsolatos kutatásokat, és elengedhetetlen segítséget nyújtott, különösen munkám kezdeti szakaszában. Köszönettel tartozom Csanaki Csillának a transzgénikus növények létrehozásában, és más kutatási feladatokban végzett fontos munkájáért. Köszönöm Stiller Ibolyának és Kondrák Mihálynak, hogy munkájukkal hozzájárulnak a *DS2*-vel kapcsolatos további kutatásokhoz.

Segítségükért, szakmai tapasztalataik megosztásáért külön köszönet illeti csoportunk valamennyi volt és jelenlegi munkatársát.

Sztankó Xéniát, Szabadi Tamásnét és Kiss Mónikát a kitűnő technikai asszisztenciáért, Takács Gábort a fotózási munkákért illeti köszönet.

Köszönöm Dr. Balázs Ervinnek és Dr. Nagy Ferencnek, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont előző és jelenlegi főigazgatójának, hogy biztosították számomra a lehetőséget az intézményben végzett munkához.

Robert Fluhr (Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Israel) bocsátotta rendelkezésünkre a *sitiens* mutáns paradicsom vonal magjait, amit ezúton is köszönök neki.