SZENT ISTVÁN EGYETEM

GÉNVADÁSZAT, STABIL GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓ ÁRPÁBAN ÉS BÚZÁBAN

Doktori értekezés

MIHÁLY RÓBERT

Gödöllő
2009

Doktori iskola:	Növénytudományi Doktori Iskola
Vezetője:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja igazgató, egyetemi tanár SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Tudományága:	Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
Program:	Növénynemesítés Genetikai és Biotechnológiai Módszerekkel
Programvezető:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja igazgató, egyetemi tanár, SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet
Témavezető:	Dr. Pauk János tudományos tanácsadó, az MTA doktora

....…… .....……

Dr. Heszky László
programvezető

Dr. Pauk János
témavezető

……

Dr. Heszky László
iskolavezető

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK 3
ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK 5
1. BEVEZETÉS 7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9
2.1. Abiotikus és biotikus stresszekkel szemben felhasználható gének, génvadászat, genomikai megközelítési módok 9
2.1.1. Génvadászat tranziens génexperessziós rendszer alkalmazásával 9
2.1.2. NBS-LRR típusú rezisztenciagének, mint biotikus kórokozóval szembeni rezisztenciaforrások 11
2.1.2.1. Lehetséges rezisztenciaforrások 13
2.1.3. Abiotikus stresszrezisztencia kialakítására irányuló génforrások, aldóz-reduktáz és aldehid-reduktáz enzimek szerepe 13
2.1.4. Az mlo-rezisztencia árpában, mint a búza lisztharmat-rezisztencia kialakításának mintája 15
2.2. A búza genetikai transzformációja 16
2.2.1. A búza genetikai transzformációja, módszertani és történeti áttekintés 16
2.2.2. A transzformánsok szelekciója 19
2.2.2.1. A *bar* marker és agronómiai szempontból fontos gén 21
2.3. Molekuláris növénynemesítés 22
2.3.1. Vírus, baktérium és gombarezisztens transzgénikus növények 23
2.3.2. Géntechnológiai sikerek abiotikus stresszrezisztencia fokozására 26
2.3.3. Géncsendesítés 27
2.3.3.1. Indukált géncsendesítés 28
3. ANYAG ÉS MÓDSZER 29
3.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer kialakítása 29
3.1.1. Növényanyag, növénynevelés 29
3.1.2. RNAi konstrukciók előállítása 29
3.1.3. Részecskebelövés és a dehidratációs stresszkezelés 31
3.1.4. GFP és DsRed detektálása fluoreszcens mikroszkópiával 32
3.1.5. Transzkript abundancia 32
3.1.6. A TIGS hatás statisztikai elemzése 33
3.2. Stabil genetikai transzformációs kísérletek búzában 33
3.2.1. Növényi anyag 33
3.2.2. A kísérletek *in vitro* körülményei 33
3.2.3. A transzformációs kísérletek során használt táptalajok 34
3.2.4. A transzformáció előkészítése 36

3.2.5. A DNS-oldat elkészítéséhez szükséges oldatok: 36
3.2.6. Alkalmazott plazmid vektorok....36
3.2.7. A DNS-oldat elkészítése a belövéshez....39
3.2.8. A búza genetikai transzformációjának lépései....40
3.2.9. DNS izolálás növényi mintákból 40
3.2.9.1. Előkészületek 40
3.2.9.2. Genomi DNS izolálása....40
3.2.10. PCR reakciók 41
3.2.11. Gélelektroforézis....46
4. EREDMÉNYEK 47
4.1. A génexperessziós tesztrendszer kidolgozásának indoklása és az előzmények 47
4.1.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer egyedi génfunkció vizsgálatára vízmegvonással stresszelt árpában....48
4.1.2. Jelölt gének tranziens indukált géncsendesítése (TIGS)....53
4.1.3. Génreguláció 61
4.2. A búza stabil genetikai transzformáció eredményei 64
4.2.1. Stabil transzformációs kísérletek, plazmidok együttes bejuttatásával 64
4.2.1.1. Transzgénikus jelölt növények molekuláris jellemzése....67
4.2.2. Stabil genetikai transzformáció MsALR gént tartalmazó transzformánsok létrehozására és a transzformánsok DNS szintű vizsgálata 74
4.2.3. NBS-LRR levélrozsda rezisztenciában jelölt gének stabil transzformációja....77
5. MEGVITATÁS....83
5.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer egyedi génfunkció vizsgálatára 83
5.1.1. A tranziens indukált géncsendesítési rendszer (TIGS) használatával elérhető teljesítmény 84
5.1.2 A tranziens indukált géncsendesítési rendszer (TIGS) értékei és korlátai 84
5.2. Genetikai alapanyagok létrehozása stabil genetikai transzformációval funkcionális genomikai kísérletekhez. 86
5.2.1. Az Mlo gén csendesítésére irányuló genetikai transzformáció....87
5.2.2. Stabil genetikai transzformáció *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz génnel. 90
5.2.3. Genetikai transzformáció NBS-LRR génanalógokkal....91
5.3. Új és újszerű tudományos eredmények....93
6. ÖSSZEFOGLALÁS....95
7. SUMMARY 99
8. IRODALOMJEGYZÉK....101
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 117

ALKALMAZOTT RÖVIDÍTÉSEK

ABA (Abscisic-acid)	abszcizinsav
DsRed, RFP (*Discosoma sp.* red fluorescent protein)	vörös fluoreszcens fehérje
EST (Expressed Sequence Tag)	expresszált szekvenciasorozat darabja az mRNS végéről
LEA protein (Late Embryogenesis Abundant protein)	embriófejlődés késői fehérjéi
MG	metilglioxál
MsALR	*Medicago sativa* aldóz-reduktáz gén
NBS-LRR	nucleotide binding site leucin rich repeat
PCR (Poimerase Chain Reaction)	polimeráz láncreakció
PPT	phosphinotricin
QTL (Quantitative Trait Loci)	kvantitatív tulajdonságot befolyásoló kromoszómarégió
RFW (relative fresh weight)	relatív friss tömeg
RWC (relative water content)	relatív víztartalom
RG	rezisztenciagén
RGA	rezisztenciagén-analóg
siRNS (small interfering)	kis interferáló RNS
RNAi	RNS interferencia
TILLING	Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TIGS (Transient Induced Gene Silencing)	tranziens-indukált géncsendesítési rendszer
VIGS (Virus Induced Gene Silencing)	vírus-indukált géncsendesítési rendszer

1. BEVEZETÉS

A szárazság - bár a Kárpát medencében az aszályt jól ismerjük - a globális klímaváltozás egyik hozadéka. A világ növénytermesztését - egyéb abiotikus stresszhatásokkal együtt, mint a káros (UV-B) sugárzások, hő- vagy fagyhatás – általánosan fenyegető abiotikus stressz. Ha az abiotikusakhoz hozzászámítjuk a biotikus stresszeket, a gomba és vírus betegségeket, már is láthatjuk milyen komoly tényezők veszélyeztetik a gabonafélék, benne az árpa és a búza termesztését.

Az utóbbi években számos gént azonosítottak transzkripciós szintű tesztrendszerekkel. Ennek ellenére csak kevés gént teszteltek funkcionális vizsgálatokkal, amelyekkel kimutatható, melyek hatása befolyásolja kedvezően a szárazságtűrést. Dolgozatomban egy tranziens vizsgálati rendszer kialakítását mutatom be, mely árpa levelek részecskebelövése révén segítséget nyújthat a kiszáradásstresszben szerepet játszó gének azonosításában, RNAi alapon vagy túltermeltetéssel. Az általunk kifejlesztett tesztrendszer a szárazságtűrés igen összetett komponensei közül elsősorban, speciálisan az ozmotikus illetve kiszáradás stressz esetén élettani hatással bíró gének felderítésére használható. A módszer megvalósításából adódóan a rendszer további fejlesztés után alkalmas lehet például sótűrésben szerepet játszó gének tesztelésére is.

Napjainkban a genetikai transzformáció a növényi funkcionális genomikai kutatás egyik kulcsmódszerévé vált, ami izolált gének beépítését és így transzgénikus növények előállítását jelenti. Az ezredforduló előtti időszak kutatásai a közvetlen és közvetett génbeviteli eljárásokat rutin módszerré fejlesztették. Ezáltal egyes gazdaságilag hasznos gének gyakorlati hasznosításán túl lehetőség nyílt, a növényi genom eddig tisztázatlan funkciójú génjeinek alaposabb elemzésére. A gének szerepéről végleges, megbízható információt nyerhetünk a gének megváltoztatott formáinak a genomba történő beépítésével és a megváltoztatott tulajdonságok jellemzésével. A stabil géntranszformációs rendszerek kifejlesztéséig hosszú és rögös út vezetett. Sok, kezdetben biztató próbálkozás mára már feledésbe merült. A gének százait bizonyos szempontból elemezni képes, rutinszerűen alkalmazott DNS chip és tranziens expressziós transzformációs rendszerek, a tesztelt gének számához képest olcsóbbak és sokkal gyorsabbak. A gének valódi funkcióját tekintve viszont nem elég informatívak. Ahhoz, hogy a kívánt géneket stabilan kifejeztessük, illetve elhallgattassuk, valóban hatékony transzformációs módszerekre van szükség. Ezek csak akkor válhatnak a funkcionális genomika effektív eszközévé, ha időben és hatékonyságban jelentős fejlesztéseket hajtunk végre.

Ph.D. értekezésemben a részecskebelövéses géntranszformációs módszer hatékonyságáról és felhasználásának elmúlt években elért

eredményeiről szeretnék számot adni. Az emberiség egyik legfontosabb élelmiszernövénye a biotechnológiai és szövettenyésztési szempontból viszonylag nehezen kezelhető búza (*Triticum aestivum* L.). A humán táplálkozásban és gazdaságban betöltött fontos szerepe miatt került a középpontba és lett a funkcionális genomikai illetve transzformációs kísérleteink célpontja. Az értekezés két kutatási téma eredményeit foglalja össze. Az első a tranziens génexpresszión alapuló tesztrendszer kidolgozásának eredményeit összegzi, amely szárazságtűrésben részvevő jelölt gének tesztelésére alkalmas. A második rész, a stabil genetikai traszformáció eredményeit foglalja össze, a létrehozott növények molekuláris jellemzésével bezárólag.

Ph.D. értekezésem **célkitűzés**ei az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Dolgozzunk ki egy közepes áteresztőképességű tesztrendszert, amely vízmegvonási stresszben érintett gének tesztelésére alkalmas. Modell növényként a diploid árpa növényt alkalmazzunk.

2. Ellenőrizzük, illetve bizonyítsuk az előbbiekben kifejlesztett tesztrendszer felhasználhatóságát dehidratációs stresszben érintett gének tesztelésére.

3. Vizsgáljuk meg, hogy különböző génexpressziós vektorokba beépített biotikus és abiotikus stresszválaszban szerepet játszó génekkel, milyen stabil transzformációs hatékonyságot tudunk elérni a részecskebelövés módszerét használva.

4. Feltételezhetően hasznos, (jelölt) biotikus és abiotikus stresszekkel szemben hatékony génekkel hozzunk létre stabil transzformánsokat, melyek későbbiekben alapanyagai lesznek funkcionális genomikai vizsgálatainknak.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Abiotikus és biotikus stresszekkel szemben felhasználható gének, génvadászat, genomikai megközelítési módok

Napjaink kutatásainak egyik legmozgalmasabb területe a genomika – növényi, állati és humán vonatkozásban egyaránt. Egyre több faj genetikai információja válik ismertté DNS szekvencia szinten is. Ezen alapinformáció mellett a legérdekesebb, illetve legfontosabb a gének élettani funkciójának és egymást befolyásoló hatásának a felderítése. A modern genomikai kutatások kelléktára napról napra gyarapszik, lényeges kérdés azonban a módszerekkel kapcsolatban az egységnyi idő alatt vizsgálni kívánt gének száma és az adott módszerrel kapott információk részletessége. A növényi genomikai kutatásban gyakorlati szempontból is fontos terület az abiotikus és biotikus stresszekkel szemben felhasználható gének vizsgálata. Dolgozatom egy közepes-nagy áteresztőképességű tesztrendszer kidolgozásáról és stabil transzformációs kísérletekkel létrehozott transzgénikus növények előállításáról ad számot. Mind a géntesztelési rendszer, mind a transzgénikus növények fontos adatokkal szolgálnak a vizsgált gének funkciójának felderítéséhez, a növények biotikus és abiotikus stresszekhez való alkalmazkodásának részletesebb megértéséhez.

2.1.1. Génvadászat tranziens génexperessziós rendszer alkalmazásával

Szántóföldön termesztett növényeink számos módszert fejlesztettek ki különböző fokú aszályos periódusok átvészelésére. Ezek közé tartoznak a különböző menekülési stratégiák, mint a korai virágzás, az elkerülés, mint a mély gyökeresedés, a fokozott vízfelvétel hatékonyság, vagy a csökkentett vízvesztés. Továbbá azon tolerancia mechanizmusok, mint a gyökérnövekedés fenntartása vízhiányos körülmények között, az ozmotikumok, antioxidánsok és fehérjék felhalmozása, melyek védenek más fehérjekomplexeket vagy membránrendszereket a gyökérben és a hajtásban (Ingram és Bartels 1996). Folytonos vita tárgya, hogy az elkerülést vagy a toleranciamechanizmusok kihasználását kellene inkább a növénynemesítési programok középpontjába állítani. Valószínűnek tűnik, hogy a toleranciamechanizmusok kihasználása célhoz vezetőbb lehet a terméshozamok stabilizálására, olyan súlyos aszályfeltételek között, mint amivel a közel-keleti vagy az afrikai országokban, valamint Ausztráliában szembesülhetünk. Egyes prognózisok szerint hasonló aszály várható a közeli időszakban Közép- és Dél-Európában is. Az ilyen extrém körülményekhez adaptálódott nemesítési anyagok általában alacsonyabb terméspotenciállal rendelkeznek (Araus és mtsai. 2002).

A transzkriptom analízis, amelyet legtöbbször *Arabidopsis thaliana* modellnövényen végeztek, a mutáns vagy transzgénikus növények fenotipizálásával együtt számos szabályozó és védő fehérjét fedett fel, amelyek szerepet játszanak a növények aszálytűrésében (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 2007). Az azonosított szabályozó fehérjék nagyjából két csoportba sorolhatók be aszerint, hogy ABA függő vagy ABA-független jelátviteli útban vesznek részt (Riera és mtsai. 2005). Az előbbi csoport tagjai transzkripciós faktorok az MYB/MYC osztályból, a bZIP osztály (AREB/ABF) melyek megkötik az ABA-reszponzív elemeket (ABRE), illetve NAC transzkripciós faktorok. Az utóbbiakhoz tartoznak az Apetala2-like transzkripciós faktorok (DREB2), melyek kötődnek az aszály-válasz (drought-response) elemekhez (DREs) (Singh és mtsai. 2002). Az említett transzkripciós faktorok szabályozzák a szárazságtűrésben és toleranciában részt vevő gének expresszióját. Expressziós profilok vizsgálatára alapozva számos szárazságstresszel összefüggő gént azonosítottak kalászos gabonák, búza és árpa esetében. Árpában eddig két multigén (Cattivelli és mtsai. 2002) családot vetettek alá részletesebb elemzésnek, különös tekintettel a géncsalád szerveződésre, valamint a dehydrin (*Dhn*) és C-repeat kötő faktor proteineket (CBF) kódoló egyedi gének szabályozására.
Mindeddig csak kevés szárazságtűréssel összefüggésben jelölt gént teszteltek közvetlenül transzgénikus árpa és búza növényekkel. Ezek között található a DREB- kódoló gén szójából, *HVA1* gén árpából, a *DREB1A* gén *Arabidopsisból* és az *Escherichia coli mtlD* génje, mely mannitol-1-foszfát dehidrogenázt kódol (Abebe és mtsai. 2003, Pellegrineschi és mtsai. 2004, Bahieldin és mtsai. 2005, Gao és mtsai. 2005). Bár genetikai (QTL) vagy asszociációs vizsgálatokból származó adatokat már közöltek szárazságtűréssel összefüggő génekről kalászos gabonák esetében, nincsenek egyértelmű bizonyítékok az említett gének szerepét illetően (Cattivelli és mtsai. 2002, Diab és mtsai. 2004, Tondelli és mtsai. 2006, Qian és mtsai. 2007). Árpa és búza lisztharmat-rezisztenciában szerepet játszó gének funkciójának közvetlen megállapítására kifejlesztettek egy tranziens expressziós rendszert, mely a levél epidermisz részecskebelövésén alapszik (Panstruga 2004, Dong és mtsai. 2006, Trujillo és mtsai. 2006, Zimmermann és mtsai. 2006, Shen és mtsai. 2007). E rendszert - mely éppúgy alkalmas gének tranziens túltermeltetésére, mint tranziens indukált géncsendesítésre (TIGS) - továbbfejlesztették a GATEWAY technológia és mikroszkóp robotizálás felhasználásával, hogy ezzel is növeljék kapacitását. (Douchkov és mtsai. 2005, Ihlow és mtsai. 2008). A létrehozott fenomikai eszköz lehetőséget nyújt jelölt, vagy önkényesen kiválasztott árpa gének százainak, akár ezreinek tesztelésére. Segítségével felderíthető, hogy egy adott gén hozzájárul-e a lisztharmat ellenállósághoz, ami modellként szolgál más gazda-patogén kölcsönhatások vizsgálatához is.
Az árpában végzett kísérleteinkhez - irodalmi adatok alapján - alkalmas markergénnek tűnt a vörösen fluoreszkáló DsRed fehérje (*Discosoma sp.* red

fluorescent protein). Biokémiai tulajdonságai alkalmassá teszik, hogy megismerjük és jelezzük a szárazságstressz tényét, súlyosságát a belőtt árpa epidermisz sejtekben. A DsRed fehérjéről korábban kimutatták, hogy fluoreszcens homo-tetramer komplex molekulává éréséhez néhány nap szükséges állati és növényi rendszerekben. Denaturáció esetén vörös fluoreszcenciából gyenge zöld fluoreszcenciára vált át. A pH változásokra nem érzékeny, viszont a vízhiánnyal járó denaturáló körülmények károsítják a kromofor védő héját. A fokozott proteolitikus aktivitás és sejthalál jelentősen csökkenti az érett DsRed mennyiségét (Baird és mtsai. 2000, Gross és mtsai. 2000). A fluorescens fehérjék szerkezetéről, tulajdonságairól és élettudományokban való széleskörű felhasználásáról az utóbbi tíz évben számos publikáció látott napvilágot (Tsien 1998, Heim és mtsai 1995, Shaner és mtsai 2005). Felhasználásuk sokoldalúságát és jelentőségét mutatja a zöld fluorescens fehérje (GFP) felfedezéséért és kifejlesztéséért 2008-ban odaítélt kémiai Nobel-díj (Shimomura, Chalfie, Tsien 2008).

2.1.2. NBS-LRR típusú rezisztenciagének, mint biotikus kórokozóval szembeni rezisztenciaforrások

A környezettudatos gabonatermesztés egyik legfontosabb problémája illetve kihívása világszerte a különböző biotróf és nekrotróf kórokozók elleni védekezés. Hatékony növényvédelem nélkül - évjárattól függően - a termésben jelentős mennyiségi és minőségi veszteségekre lehet számítani. A kémiai védekezés sokszor drága és a környezetet terheli. Ezért egyre fontosabb a rezisztens fajták nemesítése, a termesztett fajtákban és vad fajokban meglévő rezisztenciagének funkciójának vizsgálata.

Az utóbbi években a rezisztenciagének térképezése, kapcsolt markerekkel való szelekciója a kutatások homlokterébe került. Mára már több tucat klónozott és jellemzett rezisztenciagént írtak le, amelyek az általuk kódolt fehérjék szerkezete és feltételezett működési mechanizmusa szerint kilenc osztályba sorolhatók. A kórokozók legváltozatosabb csoportjait (vírusok, baktériumok, nekrotróf gombák és biotróf gombák, nematódák) felismerő receptorokat kódoló gének tartoznak szerkezeti hasonlóság alapján egyazon osztályba. Az eddig tanulmányozott rezisztenciagén-termékek jelentős része receptormolekula, vagy a jelátvitelért felelős fehérje (Hornok 2004). Az eddig ismert rezisztenciagének döntő többsége az ún. NBS-LRR (nucleotide binding site leucin rich repeat) multigén családba tartozik. Az NBS-LRR család további két altípusra TIR-NBS-LRR és CC-NBS-LRR osztható. A TIR (Toll/interleukin-1 Resistance) domén homológiát mutat a *Drosophila* Toll receptor doménnel, valamint az emlős interleukin (IL)-1 receptorával. A másik alkategóriában a molekula N-terminálisán egy un. Coiled coil szerkezetű domén található (Ayliffe és Lagudah 2004). A TIR típusú rezisztenciagének kizárólag

csak a kétszikűekben, a CC-NBS-LRR típusú molekulák egy és kétszikű növényekben egyaránt megtalálhatók. A molekulák N-terminálisán lévő eltéréseken kívül mindkét kategóriára jellemző az NBS (nucleotid binding site) domén, amely az ATP illetve GTP- kötésért felelős. Az NBS-régión belül további azonos, illetve nagyfokú homológiát mutató motívumok találhatók. Ezek az ún. P-loop, valamint a kináz-2 domének (Huettel és mtsai. 2002; Meyers és mtsai. 2003). Az NBS régióhoz csatlakozik a leucin rich repeat régió (LRR), amelyben 24 aminosav hosszúságú, ismétlődő elemek találhatók. Az elemekben szabályosan elhelyezkedő leucin, aszparagin és prolin aminosavakkal. Az ismert rezisztenciagénekben az LRR régió a legvariábilisabb, patogén felismerésben és szignáltovábbításban van szerepe. Az itt meglévő eltérések biztosítják - még teljesen azonos NBS doménnel rendelkező R proteinek esetében is - az eltérő specifitást. Ez alapján az LRR domének fontos szerepet töltenek be az új rezisztencia specifitások kialakításában. A legtöbb esetben a rezisztenciagének LRR doménjein érvényesül a pozitív szelekciós nyomás, vagyis a rezisztenciaspecifitást is ezek határozzák meg.

A rezisztenciagének és a fertőző patogén viszonyát a *„gene for gene”* modell írja le (Flor 1971). E szerint a patogén *avr* géntermék közvetlenül kapcsolatba lép a növényi sejtben jelen levő specifikus R protein LRR doménnel. Ebben a specifikus reakcióban az LRR mint közvetlen jelfogó szerepel, majd ennek következményeként beindul a növény védekező válasza, a hiperszenzitív reakció. Amennyiben ez a kölcsönhatás nem jön létre - LRR nem ismeri fel az *avr* molekulát – a kórokozó képes megfertőzni a növényt. Napjainkban a „túl” leegyszerűsített „gene for gene” modell helyett, az ettől nem sokban eltérő „guard” hipotézis az elfogadottabb (Bogdanove 2002). Ebben a modellben a receptor (LRR) nem csak passzívan várakozik az elicitorra, hanem egy folyamatos „rendszerállapot figyelést” végez. Egy még pontosan meg nem határozott ún. „őrzött” (checked) molekulaállapot változását figyeli, mely változás a kórokozók fertőzése során történik az őrzött molekulán.

A rezisztenciagének domén szerkezetében rejlő nagyfokú strukturális hasonlóság lehetővé teszi, hogy rezisztenciagéneket (RG) vagy putatív rezisztenciagén-analógokat (RGA) izolálhassunk PCR technika alkalmazásával. Az izolált rezisztenciagén-analógok részletes vizsgálata legközvetlenebbül transzgénikus növények előállításával és vizsgálatukkal dönthető el. Ha a transzformált gén expresszáltatás rezisztenciaváltozást okoz, akkor funkcionálisan rezisztenciagénnel van dolgunk, amennyiben nem, akkor csak pszeudogént vizsgáltunk. A pszeudogének strukturális hasonlóságot mutatnak a valódi rezisztenciagénekkel, de rendszerint csonkák, a korai stop kodonok, valamint deléciók miatt és ebből következően rezisztenciát nem biztosítanak. Az eddig ismert, izolált vagy az ismert genomszekvenciák adataiból kinyert lehetséges rezisztenciagén-analógok száma széles skálán mozog. Az *Arabidopsis thaliana* szekvenciák vizsgálata alapján 160 RGA azonosítható

(Meyers és mtsai. 2003), ezzel szemben a rizs adatbázis vizsgálata mintegy 600 rezisztenciagén illetve analóg predikcióját teszi lehetővé (Goff és mtsai. 2002). Búza esetében sajnos még nincsenek bőséges szekvenálási adatok, hogy azokból az RGA számát megbecsülhessük, de az bizonyos, hogy számuk a rizséhez hasonlóan több száz lehet. Eddig a búzában legalább 397 betegség vagy rovar rezisztenciát azonosítottak (McIntosh és mtsai. 2005). Jelenleg a búzában mintegy 50 rasszspecifikus levélrozsda (*Lr*) rezisztenciagénről tudunk, melyek agrobiológiailag, kórtanilag, jól jellemzettek, viszont csak két levélrozsda gén, az *Lr10* (Feuillet és mtsai. 2003) és az *Lr 21* gén (Huang és mtsai. 2003) szekvenciája ismert. A gének fizikai azonosítása, klónozása sokkal gyorsabb és hatékonyabb nemesítést tesz lehetővé. Továbbá lehetőség van arra, hogy eddig nem ismert, azonosítatlan rezisztenciagéneket a génekben rejlő homológia alapján izolálhassunk.

2.1.2.1. Lehetséges rezisztenciaforrások

Korábbi széleskörű kísérletek alapján, mint lehetséges rezisztenciagén-forrás képbe került a termesztett búza egy rokon faja a *Triticum monococcum* L. Ezt a diploid fajt, az „A" homeológ genom ősének tekintik. Termesztése kis területen jelenleg is folyik (erdélyi havasok), de termésmennyisége miatt a kenyérbúza kiszorította a termesztésből. A jelenleg búzában megtalálható szárrozsda-rezisztenciagének jelentős része szintén a *monococcumból* származik, az ismert levélrozsda-rezisztenciagének viszont egyike sem *monococcum* eredetű. A *monococcum* kiváló levélrozsda rezisztenciával rendelkezik. Újabban jelentős kutatásokat folytatnak a *T. monococcum*ban található levélrozsda rezisztencia jellemzésére és hasznosítására (Vasu és mtsai. 2001, Anker és mtsai. 2001, Sodkiewicz és Strzembicka 2004).

Dr. Kovács Géza (MTA MGKI, Martonvásár) és szegedi intézeti munkatársunk, Dr. Purnhauser László eredményei azt mutatják (szóbeli közlés), hogy a *T. monococcum* változatlanul ígéretes levélrozsda rezisztenciaforrás. Az eredményeik alapján a vizsgált *monococcum* törzsek mindegyike jól felhasználható NBS-LLR rezisztenciagén analógok izolálására. Martonvásáron több mint száz *monococcum* törzs génbanki fenntartását és vizsgálatát végezték el. Mindezek alapján egy olyan genotípust választottunk ki, amely rezisztens levélrozsdára, de 3-4 t/ha termőképessége alapján Németországban már ökológiai termesztésben is megjelent (Purnhauser 2006).

2.1.3. Abiotikus stresszrezisztencia kialakítására irányuló génforrások, aldóz-reduktáz és aldehid-reduktáz enzimek szerepe

Két enzim élettani szerepe – elsősorban detoxifikáló szerepük miatt – főleg humán és állatélettani kutatásokból jól ismert. Az aldóz-reduktáz számos

emlősfajban (egér, patkány, nyúl, szarvasmarha, sertés, ember) és szövetben (vese, máj, szemlencse, retina) megtalálható aldo-keto-reduktáz enzim (Jez és mtsai. 1997), melynek az állatok vesesejtjeiben ozmoregulációs szerepe van. Az aldóz-reduktáz és az aldehid-reduktáz enzimek az állati sejtekben detoxifikáló szereppel is rendelkezhetnek, széles szubsztrátspecifitásuknak köszönhetően. A különböző sejtkárosító hatások következtében reaktív aldehid és keton vegyületek keletkeznek. A kísérleti adatok szerint ezek kémiai átalakításán keresztül, károsító hatásaik megszüntetésében játszhatnak szerepet az aldóz-reduktáz enzimek (Srivastava és mtsai. 1995 és 1999, Vander Jagt és mtsai. 1992). Az aldehid-reduktáz enzimek az aldózreduktázokhoz hasonlóan sokféle aldehid szubsztrátot képesek a megfelelő alkohollá redukálni NADPH koenzim jelenlétében (Bohrein és mtsai. 1991).

Az utóbbi idők kutatásai azt igazolják, hogy a legtöbb stresszténye ző reaktív szabadgyökök keletkezését váltja ki a növényekben is (Price és mtsai. 1989, Moran és mtsai. 1994). A növényi sejtekben az állati szervezetekhez hasonlóan a lipidperoxidáció jelentős tényezője a stresszhatásoknak. Ezt kiválthatja öregedés (Dhindsa és mtsai. 1984), nehézfémek (Gallego és mtsai. 1996), savas eső (Chia és mtsai. 1984), UV-B sugárzás (Vass 1997).

Vander Jagt és mtsai. (1992) szerint az aldóz-reduktázoknak a 2-oxo-aldehid metilglioxál (MG) átalakításában is szerepük van. Ami szintén egy reaktív, minden élő sejtben előforduló citotoxikus vegyület. Keletkezhet spontán a glikolízis és fotoszintézis során (Richard 1993), illetve enzimatikusan. A metilglioxál már alacsony koncentrációban is káros a sejtre, ezért rendkívül fontos a hatékony detoxifikálása, amelyet elsősorban a glioxaláz rendszer végez. Vander Jagt és mtsai. (1992) szerint az aldóz-reduktáz a glioxaláz rendszer mellett részt vehet a sejtekben keletkező MG átalakításában, ugyanis a metilglioxált acetollá redukálja, a keletkezett acetolt pedig 1,2-propándiollá alakítja.

Espartero és munkatársai (1995) kimutatták, hogy a glioxaláz enzimet kódoló *GLXI* gén sóstresszre indukálódott paradicsomban. Véleményük szerint az indukció oka a fokozott glikolízis, mely a sejtek megnövekedett energiaigényével magyarázható. Ezáltal megnőtt a lehetősége a MG-trióz-foszfátokból való képződésének.

Veena és munkatársainak (1999) eredményei alapján, transzgénikus dohány növényekben, a *GLXI* túltermelését követően megnövekedett ellenállóságot mutattak a növények sókoncentráció okozta ozmotikus stresszel szemben. Ezért fontos a metilglioxál hatékony detoxifikálása, mert abiotikus stresszhatással szemben ellenállóságot érhetünk el a növényekben.

1993-ban Lee és munkatársai izolálták az aldóz-reduktáz homológ gént rozsnok szuszpenziós sejtekből, amikor abszcizinsav hormonra indukálódó géneket kerestek. Kimutatták, hogy abszcizinsav hormonkezelés hatására növekszik a sejtek alacsony hőmérséklettel szembeni ellenállósága. A rezisztencia fokozódásával pedig párhuzamosan a rozsnok aldóz-reduktáz

génexpressziója is növekszik. Abszcizinsav hormonkezelés után megnövekedett aldóz-reduktáz aktivitás is kimutatható volt a sejtek részleges tisztítását követő fehérjekivonatban.

A legjobban jellemzett egyszikű növényi enzim az árpa aldóz-reduktáz homológ gén által kódolt fehérje (Bartels és mtsai. 1991, Roncarati 1995). Az árpa gént differenciálszűrés módszerével izolálták szárazságtűrő embrióból készített génbankból, a rozsnok aldóz-reduktáz génhez hasonlóan. Kísérleti eredmények alapján az árpa genomjában alacsony kópiaszámban van jelen az aldóz-reduktáz gén, aminek kifejeződése fejlődésspecifikus és hormonregulált. A gén transzkriptuma és a transzlálódó fehérje akkumulációja párhuzamosan nő az árpa embrió szárazságtűrésének kialakulásával és a szárazságtűrő embrióban éri el maximumát. Vegetatív szervek közül nem mutatható ki sem levélben, sem gyökérben. A gén expressziója hormonregulált. Az abszcizinsav serkenti, a gibberellinsav gátolja a gén kifejeződését.
Árpa és rozsnok aldóz-reduktáz gének az abiotikus stresszténye zőkkel szemben kapcsolatot mutattak. A két gén kifejeződése hormonok által szabályzott. Az árpa esetében az embriók szárazságtűrésével, rozs esetében pedig fagytűréssel szemben találtak kapcsolatot. Ezzel szemben a lucerna (*Medicago sativa* L.) aldóz-reduktáz fehérje (MsALR) a növény minden szövetében előfordul. Az *MsALR* gén terméke nemcsak szövetspecifitásban, hanem szekvencia alapján és funkcionálisan is eltér az egyszikűekben található aldehid-reduktázoktól. Ezt hazai kutatások is igazolták munkánk előzményeként (Oberschall és mtsai. 2000).

2.1.4. Az mlo-rezisztencia árpában, mint a búza lisztharmat-rezisztencia kialakításának mintája

A rezisztencianemesítés számára a búzát fertőző kórokozók közül a lisztharmat jelenti a betegségek elleni küzdelemben az egyik legnagyobb feladatot. A patogénnel szemben napjainkig már 45 rezisztenciagént, vagy ezeken belül jól elkülöníthető allélt azonosítottak világszerte. E gének nagy többsége már „elveszítette” hatékonyságát. A rezisztencia instabilitása főként a lisztharmat populáció rendkívüli változékonyságával és változatosságával magyarázható. Ilyen körülmények között megnő a mennyiségi (kvantitatív) típusú rezisztencia jelentősége. Nem véletlen, hogy az utóbbi években több QTL-t (kvantitatív tulajdonságot befolyásoló kromoszómarégió, Quantitative Trait Loci) írtak le. A búzanemesítési programokban is kiemelkedő súllyal szerepel azon fajták szelekciója, melyeken a kórokozó az átlagosnál jóval kisebb levélfelületet fertőz, és azt is csak a tenyészidőszak későbbi szakaszában.

Minden növény számos aktív védekezési mechanizmussal rendelkezik. Ilyen sejtfal „megerősítési tulajdonsággal” rendelkezik az árpa (*Hordeum vulgare* L.) is. Papillaképződéssel reagál, amely a sejtfal helyi megvastagodását

jelenti, amely kizárólag a sejtfalnak arra a kis részére korlátozódik, ahol közvetlenül érintkezik egymással a kórokozó és a gazda sejtje. A papilla főleg kallózt és lignint tartalmaz. Ezen kívül fehérjék, szuberin, szilícium-oxidok rakódnak bele.

Az árpa *mlo* gén által meghatározott lisztharmat elleni rezisztencia is papillaképződéssel van kapcsolatban. A papillákban különböző antimikrobiális hatású fenolok és hidrogén-peroxid halmozódik fel, ami kompatíbilis esetben nem fordul elő (Hückelhoven és mtsai, 1999). Lisztharmat fogékony árpában a kalmodulin az *Mlo* gén kódolta fehérjéhez kapcsolódik, ami kiváltja a kalcium beáramlását a sejtbe, és ezen keresztül elhallgattatja a lisztharmattal szembeni rezisztenciát. Az *mlo* rezisztencia az MLO fehérje hiányában lép fel, ami egy pontmutáció következménye. Úgy tűnik, hogy ebben az esetben a fogékonyság nem passzív, hanem aktív, indukált jelenség.

2.2. A búza genetikai transzformációja

Az ezredfordulón a búza funkcionális genomikai kutatás kulcsmódszerévé a genetikai transzformáció vált, ami izolált gének beépítését és így transzgénikus növények előállítását jelenti. A rizs után a búza a világ második legfontosabb apró szemű gabonája, amely a világ élelmezésében alapvető szerepet játszik. Termesztési története egybefonódik az emberiséggel, ebből adódóan érthető, hogy miért áll a kutatások középpontjában. A magyarok számára a búza (biblikus hatásra) fontos szimbólum növénnyé vált. Közgazdasági szempontból a legfontosabb, amit termesztési hagyományaink, kedvező agroökológiai körülményeink, a múlt nemesítési eredményei is alátámasztanak. A genetikai transzformáció kutatása és gyakorlati alkalmazása a modern genetikai kutatásban szükségszerűnek mondható. A gének szerepéről, funkcionális működéséről megbízható információt nyerhetünk, a gének idegen vagy azonos fajú genomba történő beépítésével és a megváltoztatott tulajdonságok jellemzésével.

2.2.1. A búza genetikai transzformációja, módszertani és történeti áttekintés

Ha rövid történeti áttekintést teszünk, látható, hogy az első búza transzformációs eredmények (Zhou és mtsai. 1992, Kloti és mtsai. 1993) – amelyek a gének protoplasztokban történő sikeres tranziens expresszióját és transzformált kalluszok előállítását jelentették – az 1990-es évek elején meglehetősen nehezen születtek meg. Akkor még úgy gondoltuk, hogy az izolált protoplasztokba (Pauk és mtsai. 1994) történő génbeépítés hozza majd meg a módszertani áttörést a búza genetikai transzformációjában. Mint azt ma már tudjuk, a stabil búzatranszformáció kulcsa a génbelövésre alapozott eljárás

- majd később - az agrobaktérium (*Agrobacterium tumefaciens*) által közvetített módszer lett. A magyar transzformációs eredmények megalapozása viszont jóval korábbra tehető.

A hazai kutatók már a kezdeti transzformációs kísérleteket megelőzően is meghatározó szerepet játszottak a búza sejt- és szövettenyésztési módszereinek kidolgozásában. (Dudits és mtsai. 1975, Heszky és Mesch 1976). Ezek a szomatikus és haploid szövettenyésztési eredmények alapvetően hozzájárultak ahhoz, hogy ma differenciálatlan, szomatikus és haploid szövettenyészetekből fertilis növényeket tudunk előállítani. E nélkül a módszertani háttér nélkül nem lehetne napjainkban a búza genetikai transzformációjáról értekezni.

A módszertani és újdonság jellegű publikációkat (1993-96) követően, hozzávetőlegesen 1996-tól jelentek meg olyan közlemények, melyek a búza valamely fontos tulajdonságát módosítják transzgénikus módszerrel. Ettől az időszaktól egy új, nemesítési szempontból is fontos szakasz kezdődött el a búza genetikai transzformációjának történetében. Ezek az eredmények már molekuláris szinten adtak információt egy-egy beltartalmi tulajdonságról vagy biotikus és abiotikus körülményekhez való jobb alkalmazkodást biztosító molekuláris nemesítési megoldáshoz.

A búza genetikai transzformációja jelentős kihívás elé állította a kutatókat. A legegyszerűbb módszernek a pollentömlőbe történő DNS-bevitel látszott (Chong és mtsai. 1998), de ez az eljárás nem hozott maradandóan nagy eredményeket. Az első publikációk a közvetlen génbevitel kezdeti sikereiről szóltak (Lörz és mtsai. 1985). Idegen gének bejuttatására az egyszikűeknél hosszú ideig a protoplaszttechnika ígérkezett a leghatékonyabb módszernek. Az első búza transzformációs irodalmi adatok a polietilén-glikollal (PEG) közvetített génbevitelről számoltak be (Vasil és mtsai. 1991, Marsan és mtsai. 1993). A közleményekből és saját tapasztalatokból kiderült, hogy a genetikai transzformációnak ez a módja rendkívül nehézkes és időigényesnek mondható. A protoplasztok izolálásán és a polietilén-glikol kezelésen túl az eljárást az is nehezítette, hogy a protoplaszt eredetű kalluszokból a fertilis növények felnevelhetősége csekély gyakoriságú, illetve genotípushoz kötött (Pauk és mtsai. 1994). Mórocz és mtsai. (1990) kukoricával született eredménye viszont bizonyította, hogy a genetikai transzformációnak a protoplaszt-technika is hatékony eszköze lehet. (Omirulleh és mtsai. 1993; Golovkin és mtsai. 1993).

A közvetlen génbeviteli módszer protoplasztizolálást és polietilén-glikol (PEG) kezelést igényelt. A polietilén-glikol kitágította a búzaprotoplasztok pórusait, és a transzformációs oldatba adagolt DNS a sejthártya pórusain át bejutott a sejtekbe. A DNS bejutása feltehetően akkor történik meg, amikor a PEG oldat magas ozmotikus értéke hígításkor csökkenni kezd és megfordul az ozmózis iránya (Bittencourt és mtsai. 1995). A polietilén-glikol kezelés megszüntetése után a pórusok bezáródtak, a sejtmembrán és a sejtfal is regenerálódott. A sejtekben maradt DNS az osztódások megfelelő szakaszában beépült a befogadó sejt genomjába. A módszer lényege, hogy a transzformáció

és az azt követő sejtkolóniából történő regeneráció egyedi sejtekből indul ki. Az egyedi protoplaszt sejtekből felnevelt növény minden sejtje hordozza a bejuttatott szekvenciát. Jelentős hátránya, hogy a növények regenerációjára alkalmas szuszpenzió kialakítását feltételezi. Sajnos a búzaszuszpenziók gyorsan elvesztik regenerálódási képességüket (Dimaio és Shillito, 1989), vagy olyan jelentős genetikai változást szenvednek, hogy gyakorlati célú felhasználásuk jelentősen lecsökken. A szegedi Gabonakutató is csaknem tíz évet fordított a protoplaszt-növény rendszer kialakítására. A növényregenerációra képes szuszpenzió kialakításával szerzett tapasztalatokat viszont később jól tudták alkalmazni a szuszpenziós tenyészetek génbelövésére.

Szövetek és sejtek elektroporációjával is jelentek meg közlemények egyes gabonafajok felhasználásával (Laurensen és mtsai. 1994; Xu és Li, 1994), de búza esetében ez a módszer nem vezetett sikerre. Sajnos ez az eljárás nem tudta a búzát a rutinmódszerrel transzformálható fajok szintjére emelni. Ismert egy olyan megoldás, ami a génbelövéshez hasonlóan szilárd hordozókkal (pl.: szilícium-karbid) juttatott be búzasejtekbe rekombináns DNS-t (Serik és mtsai. 1996, Petolino és mtsai. 2000), de kiterjedtebb alkalmazását az első pozitív eredmények óta nem találjuk a szakirodalomban. Az eddig említett módszerek elterjedését bizonyos mértékig akadályozta a génbelövés módszerének gyors elterjedése.

Közismert, hogy a közvetített génbevitel az egyszikű fajoknál hosszú évekig nem jöhetett számításba, abból a tényből eredően, hogy az *Agrobacterium* csak kétszikű növényeket képes fertőzni. Hiei és mtsai. (1994) rizsben tett felfedezése óta azonban nagy változás állt be. Az első sikeres *Agrobacterium*-közvetített rizs transzformációs eredmények (Hiei és mtsai. 1994; Tingay és mtsai. 1997) az 1990-es évek elejére tehetők. A szegedi Gabonakutató Kht. is elkezdte a módszer adaptálását. Mindeddig azonban a Sanford (1988) által szabadalmaztatott részecskebelövés elvén alapuló módszer bizonyult a leghatékonyabbnak búzában. A következőkben ismertetett eredmények túlnyomó többsége is ezzel a módszerrel született. A gének mesterséges bejuttatásában módszertani szempontból nagy jelentőségű volt a Cornell Egyetemen kifejlesztett részecskebelövő berendezés, ismert nevén a génpuska. Az első fertilis, transzgénikus búza növényeket ezzel a módszerrel hozták létre Vasil és mtsai. (1992), valamint Weeks és mtsai. (1993). Két különböző eredetű (*Streptomyces hygroscopicus – bar, Escherichia coli – uidA*) mikrobiális gént jutattak be búzába, melyek jelenlétét és működését is bizonyították. Esetükben a tavaszi búza éretlen embrióinak génbelövésétől a transzgénikus növények virágzásáig mindössze 168 nap telt el, azaz kevesebb, mint fél év. A transzformációs eredményt több kutatócsoport (Nehra és mtsai. 1994; Becker és mtsai. 1994) is sikeresen ismételte meg, kisebb módszertani fejlesztéseket közölve.

Valamennyi idézett eredményben közös vonás, hogy *bar* herbicidrezisztenciát kódoló gént jutattak be búzába. Ezt a gént – mint marker

gént – növénytranszformációkban ma már széles körben használják különböző foszfinotricin hatóanyagú szelekciós rendszerekben. Több kutatócsoport is megerősítette a transzformációs eredmények alapján, hogy az agronómiai szempontból fontos herbicidrezisztencia-bevitelnek nincs technikai akadálya a búza esetében (Vasil és mtsai. 1992; Nehra és mtsai. 1994; Jordan és mtsai. 1995; Alpeter és mtsai. 1996; Qureshi és mtsai. 1996; Witrzens és mtsai. 1998).

A hazai transzformációs kutatás intenzitását és sikerességét bizonyítja a gödöllői fejlesztésű részecskebelövő berendezés (GENEBOOSTER) kifejlesztése, mely hatékonyságban és a technikai paraméterek tekintetében nemzetközi szinten is megállja a helyét (Jenes és mtsai 1996).

A Gabonakutató Kht. saját búzatranszformációs kísérleteiben elért eredményeiről 1998-ban számoltunk be először (Pauk és mtsai. 1998). Munkánk során *bar* gént jutattunk be búzába, és a hosszú szelekciós idő fontosságát bizonyítottuk, amely nagyobb rezisztens kallusz hozamot eredményezett. A foszfinotricin-acetil-transzferáz enzim aktivitását minden regenerált transzformáns növényben bizonyítottuk. A leghatékonyabb közvetlen génbeviteli eljárás laboratóriumunkban az Altpeter és mtsai (1996) által kidolgozott eljárás általunk több ponton, leginkább a szelekciós rendszerben tett, változtatásokon alapszik.

2.2.2. A transzformánsok szelekciója

A génbevitel után a transzformált sejteket nem transzformált sejtek veszik körül. A transzformáció döntő lépése azon sejtek szelektálása és felszaporítása, melyekben a transzgén nemcsak integrálódott a nukleáris genomba, de expresszálódik is. Ilyen sejtek azonosítása és kiválogatása markergénekkel lehetséges. Ezek legtöbbször rezisztenciagének, melyek ellenállóvá teszik a növényt antibiotikumokkal vagy herbicidekkel szemben. Ezen toxinok a vadtípusú sejtek növekedését gátolják, vagy elpusztítják azokat, míg a transzgénikus sejtek életképessége megmarad. A rezisztenciagének mellett egyéb szelekciós gének is léteznek.

A rezisztenciagének egyik csoportja az aminoglikozid alapú antibiotikumokkal szemben biztosít rezisztenciát. Ide tartozik többek között a kanamicin, a gentamicinB, a geneticin, a neomicin, a paromomicin és a sztreptomicin (Jelenska és mtsai, 2000). Az aminoglikozidok baktériumölő hatása elsősorban úgy valósul meg, hogy irreverzibilisen hozzákötődnek a riboszómákhoz.

A rezisztenciagének mellett megjelentek az úgynevezett funkcionális szelekciós gének, melyeket már a gabonafélék transzformációjánál is sikeresen használtak. A pozitív funkcionális szelekció (Haldrup és mtsai. 1998) olyan stratégia, amely a transzgénikus sejteknek metabolikus előnyt ad a nem transzformált sejtekkel szemben. Ezt az új markerrendszert úgy tervezték, hogy ártalmatlan legyen mind a fogyasztókra, mind a környezetre. A búza-

transzformációnál is használt egyik pozitív szelekciós rendszerben az *E. coli* baktériumból származó foszfomannóz-izomeráz (*pmi*) gén a markergén (Wright és mtsai, 2001). Az enzim átalakítja a növények számára nem hasznosítható mannóz-6-foszfátot a metabolizálható fruktóz-6-foszfáttá, így a markergént tartalmazó sejtek mannóz-6-foszfát tartalmú táptalajon is képesek osztódni, ellentétben a nem transzgénikus sejtekkel. A pozitív funkcionális markerek közé tartozik még az izopentenil-transzferáz (*ipt*) és a *rol* gén is. (Kunkel és mtsai. 1999). Az *ipt* gén egyike az *Agrobacterium tumefaciens* sejtburjánzást indukáló génjeinek, mely a citokinin bioszintézis egyik enzimét kódolja. A bevitt gén hatására a transzgénikus növényi szövet citokininszintje megnövekszik, így a növény elveszíti apikális dominanciáját és gátlódik a gyökérképződés. Az *Agrobacterium rhizogenes* eredetű *rol* gén az úgynevezett „hairy roots" kialakulásáért felelős, valamint a gén hatására a növény levele ráncossá válik, megrövidülnek az internódiumok és csökken az apikális dominancia is. Az *ipt* vagy a *rol* génekkel a transzgénikus növények fenotípusa megváltozik, így vizuálisan megkülönböztethetőek a nem transzgénikus növényektől. A pozitív funkcionális szelekció mellett léteznek negatív szelekciós markerek is. Ilyen gén a bakteriális citozin deamináz (*codA*) gén, mely a nem toxikus 5-florcitozint az eukarióta sejtek számára mérgező 5-fluoruracillá alakítja át. A gén hatását és további alkalmazhatóságát transzgénikus rizsben tanulmányozták (Dai és mtsai. 2001).

Sok esetben a kívánt gén csak meghatározott körülmények között, bizonyos sejttípusokban működik, enzimfunkciója vagy aktivitása nem mérhető, ezért alkalmaznak úgynevezett riporter géneket, melyek géntermékei könnyen kimutathatók. A riporter gének olyan genetikailag és biokémiailag jól értelmezett gének, melyek más gének regulátor szekvenciáival fuzionálhatók, és aktivitásuk a célszervezetben normális körülmények között nem mutatható ki. Ilyen riporter gén rendszerek közé tartozik a β-glükuronidáz (*GUS*). Az *E. coli uid*A (*GUS* gén) lokusza által kódolt hidroláz a β-glükuronidok több típusának lebontását katalizálja: p-nitrofenil-glükuronid (PNPG), 4-metil-umbelliferil-glükuronid (MUG), 5-bróm-4-klór-3-indol-β-D-glükuronid (*X-gluc*). E vegyületek közül a MUG fluorogén, hidrolízise fluoreszkáló vegyületet hoz létre. Az *X-gluc*-ot elsősorban hisztokémiai festésre alkalmazzák, mert a hidrolízisét követő oxidatív dimerizációval kék, oldhatatlan indigó festék keletkezik (Jefferson 1987). Mivel a növényekben elhanyagolható vagy egyáltalán nem található endogén *GUS* aktivitás, a *GUS* génkonstrukciók a transzformáció kimutatására, a megfelelő promóterek tesztelésére és a génkonstrukciók hatékonyságának, az mRNS stabilitásának és a génexpresszió antiszensz gátlásának vizsgálatára alkalmazhatók. Másik igen jelentős riporter gén a luciferáz gén, mely a luciferáz enzim D-luciferin ATP-függő oxidatív dekarboxilálását katalizálja oxiluciferinné. A gén a szentjánosbogár *(Photinus pyralis)* luciferáz génjéből (*luc*) vagy baktériumból *(Vibrio harveyi)* (*lux*) származik (Koncz és mtsai. 1987). A pH=7,5 – 8,5 értéken kibocsátott

sárgászöld fény rendkívül érzékeny detektálást tesz lehetővé a növényi szövetek roncsolása nélkül (Ow és mtsai. 1986; Millar és mtsai. 1992). Hátránya azonban, hogy a detektálás speciális műszert, luminométert igényel. A medúza *(Aequorea victoria)* eredetű Green Fluorescent Protein (GFP) egyre gyakrabban használt marker a növényi transzformációban (Tsien 1998). Ez a fehérje roncsolásmentesen teszi lehetővé a transzgénikus sejtek vizuális azonosítását. A rendszer kis toxicitású, szövettől és genotípustól független, és széleskörűen használt a gabona transzformációban (Tamás és mtsai. 1999; Miki és McHugh 2004). Napjainkban a fluoreszcens proteinek génjeinek széles köre áll rendelkezésre, mint pl.: mPlum, mCherry, DsRed, mOrange, EYFP stb. Markergénként való felhasználásukat számos szempont befolyásolja pl.: fotostabilitás, detektálhatóság, érés gyorsasága és intenzitása (Shaner és mtsai. 2005).

2.2.2.1. A *bar* marker és agronómiai szempontból fontos gén

A glufozinát-ammoniumot a fehérjeszintézist gátló herbicidek közé sorolják, mert hatását a glutaminszintézis gátlásán keresztül fejti ki. Mint savat 1972-ben fedezték fel, ekkor kapta a foszfinotricin (PPT) nevet. Ezt a növényekre toxikus anyagot egy talajlakó baktérium, a *Streptomyces viridochromogenes* termeli. A növényben irreverzibilisen gátolja a glutaminszintézist, a glutaminnak glutaminsavból és ammóniából történő képződését. A felvett ammónia illetve ammóniává redukált, felvett nitrát nem tárolódik, nincs tárolt aminocsoport. A felhalmozódó ammónia egy idő után toxikus mértékben lesz jelen, ami a növény pusztulását eredményezi. (Nosticzius 1992). A nyolcvanas évek második felében sikerült izolálni a *Streptomyces hygroscopicus*-ból a *bar* gént. A PPT nem károsítja a baktériumot, melynek oka a *bar* gén fehérjeterméke, a foszfinotricin-acetil-transzferáz (PAT). Ez az enzim a foszfinotricint inaktiválja úgy, hogy a szabad NH_2-csoportját acetilálja. A *bar* génnel transzformált kultúrnövények rezisztensekké váltak a PPT-típusú herbicidekkel (Basta, Liberty, Finale, Ignite) szemben. Ezek hatóanyaga a glufozinát-ammónium. A rezisztenciát szántóföldi körülmények között tesztelve bebizonyosodott, hogy a transzformált növények a herbicid normál dózisának többszörösét is elviselik károsodás nélkül. A növényekben nem halmozódik fel az ammónia és fenotípusosan sem térnek el a kontroll egyedektől. Az első glufozinát rezisztens növény az AgrEvo Libertylink® repcefajtája volt, amely 1996-ban került köztermesztésbe az USA-ban, Kanadában, valamint az Egyesült Királyságban. Azóta számos kultúrfaj glufozinát rezisztens fajtáját állították elő (pl. kukorica, szója, cukorrépa) (Heszky és Dudits, 1999).

2.3. Molekuláris növénynemesítés

A klasszikus genetikai ismeretekre alapozott növénynemesítés a fenotípusból indul ki és a keresztezéseket követő generációk tulajdonságaiból próbál következtetni a genotípusra (Heszky és Dudits, 1999). A géntechnológiára alapozott molekuláris növénynemesítés a genotípusból indul ki és annak tudatos megváltoztatásával állítja elő a kívánt fenotípust. Tehát „mérnöki módon" megváltoztatja az adott növény tulajdonságait, különböző képességeit, a tulajdonságokat kódoló gént a DNS molekula szintjén. A géntechnológia, mint molekuláris növénynemesítési módszer a molekuláris biológia, sejtgenetika és szövettenyésztés különböző módszereit alkalmazza, melyek lehetővé teszik az egyes tulajdonságokért felelős gének izolálását, azok jellemzését és felszaporítását. A gazdaságilag jelentős gént olyan vektorba építik be, mellyel lehetővé válhat a gén átvitele recipiens sejtbe. A vektor biztosítja továbbá a genomba való beépülést és annak funkcionális működését. A folyamatnak az egyik legizgalmasabb része, hogy a transzformáns sejtből intakt növényt hozzunk létre, amely nemcsak tartalmazza, de ki is fejezi a bejuttatott gént.

A ma ismert transzgénikus növények mindössze csak néhány tulajdonságban térnek el a kiinduló genotípustól. Ezeknek az új tulajdonságoknak azonban komoly termesztéstechnológiai, kereskedelmi vagy ipari értékük van (Khachatourians és mtsai. 2002).

A géntechnológiára alapozott molekuláris nemesítéssel számos olyan probléma megoldható, melyekre a klasszikus nemesítési módszerek nem kínálnak megoldást. A géntechnológia viszont nem képes helyettesíteni a hagyományos fajta-előállítást. Nem lehetséges az a megoldás, amitől sokan tartanak, hogy a géntechnológiai nemesítés kiszorítja a hagyományos nemesítési módszereket. A két módszer szorosan egymásra van utalva, így nem kizárják, hanem kiegészítik egymást, úgy, ahogy a fejezet címében szerepel: molekuláris növénynemesítés. Az első szó a modern módszereket jelenti, a második, a kb. 150 éves hagyományos növénynemesítést takarja, amely tágabb értelemben ennél is régebbre nyúlik vissza. Majdnem egyidős az emberiséggel.

A gazdaságilag jelentős transzgénikus növények három nagy csoportba sorolhatók, mint azt több kézikönyvben is találjuk (Dudits és Heszky 1999), alább csak a magyarokat idézve.

1. *Az elsőgenerációs transzgénikus növények* esetében a stratégia a mezőgazdasági termelés, az agrotechnika segítése volt a cél. A genetikai módosítások céljai: a biotikus (vírus, gomba, baktérium, rovar) rezisztencia, illetve az abiotikus (herbicid) rezisztencia kialakítása. Napjainkig tulajdonképpen a rovar rezisztens és herbicidrezisztens növények azok, melyeket a legnagyobb területen termesztenek a világon. Különösen sikeresnek tekinthetők a GM fajták gyapot, szója, repce és kukorica fajok esetében

(Heszky, 1999). Az elsőgenerációs transzgénikus növényfajták elterjedése a világban azonban sok akadályba ütközött és ütközik. A figyelem ezért a zárt rendszerben termelhető GM növények előállítása felé fordult, melyek már a második generációs transzgénikus növényeket jelentik.

2. *A második generációs transzgénikus növények* esetében a stratégiát speciális minőség előállítása jelenti, főleg a fogyasztói és élelmiszeripari igények jobb kielégítése céljából. A konkrét genetikai módosítások célja a növények anyagcseréjének, növekedésének és fejlődésének módosítása. Az első sikeres második generációs GM fajták paradicsom, repce, burgonya esetében már köztermesztésbe kerültek. Terjedésük azonban lényegesen lassúbb, mint az első generációs GM növényfajtáké.

3. *A harmadik generációs transzgénikus növények* esetében a cél olyan GM növények előállítása, melyeket mint bioreaktorokat lehet felhasználni speciális molekulák előállítására, főleg gyógyszeripar, műanyagipar, takarmányipar számára. Ide tartoznak azok a transzgénikus növények is, melyekben a transzgén expressziója specifikus promoterekkel szabályozott. Tehát a gén a növény életének meghatározott szakaszában és a növény megfelelő szervében vagy szövetében működik, illetve működése kémiailag az ember által bármikor kiváltható. Az első sikeres termékét ennek az irányzatnak a GM banán „fogyasztható” vakcinája (Kumar és mtsai 2005).

A dolgozatban bemutatott stabil transzformációs kutatásaink elsősorban a növényi biotikus és abiotikus stresszválaszban szerepet játszó gének funkcionális analíziséhez szolgáltatnak a jövőben új eredményeket, az általunk fejlesztett tranziens transzformáción nyugvó tesztrendszer szintén ezen a területen jelent kutatási előrelépést.

2.3.1. Vírus, baktérium és gombarezisztens transzgénikus növények

Legkevesebb hétszáz olyan növénypatogén vírus ismert jelenleg, mely gazdasági növényeinket különféle módon és mértékben károsítva jelentős termésveszteségeket okoz szerte a világon (Hull és Davies, 1992). Éppen ezért vírusrezisztens fajták előállítása - számos növényfaj esetében - a nemesítés alapvető célkitűzése napjainkban. A rezisztenciagén forrása sok esetben a termesztett növényfaj vagy fajta vadon termő rokonfaja, változata. Számos gazdasági növény, illetve víruskórokozó esetében azonban nem ismeretes a nemesítők számára elérhető természetes rezisztenciagén. A molekuláris genetikai módszerek felhasználása lehetőséget teremt egyrészt a már ismert rezisztenciagének izolálására, szükség szerinti módosítására és más, a rezisztenciaforrással nem rokon fajok genetikai állományába való beépítésre. Másrészt úgynevezett „mesterséges” rezisztenciagének is konstruálhatók, ahol a

rezisztenciagén forrása gyakran maga a vírus kórokozó (PDR=pathogene derived resistance) (Hull és Davies, 1992; Scholthof és mtsai. 1993). Ez a megközelítés az esetek túlnyomó többségében vírusgének izolálásán és a növényekben való kifejeztetésén alapul. A legkülönbözőbb expresszált vírus DNS és RNS-szekvenciák egyaránt alkalmasnak bizonyultak rezisztencia kialakítására transzgénikus növényekben. A legkorábbi ide vonatkozó közlemény szerint az árpa sárga mozaik vírus köpenyfehérje génjét juttatták be búzába, de nem közöltek információkat a növények betegségekkel szembeni ellenállóságáról (Karunaratre et al. 1996). A mutáns baktérium *ribonuclease III.* gént expresszáló növények viszont magas fokú ellenállóságot mutattak az árpa csíkos mozaik vírussal szemben. (Zhang et al. 2001.)

Figyelembe véve a bakteriális kórokozók által okozott jelentős veszteségeket, világszerte intenzíven kutatják azokat a géntechnológiai lehetőségeket, amelyek ellenállóságot biztosítanak a gazdasági növényeink számára. A növénynemesítés során a nemesítők keresztezéssel építik be a rezisztenciagéneket, amelyeket a fajtagyűjteményekben vagy rokon vad fajokban fedeztek fel. További rezisztenciát biztosító génbeépítési stratégiák kidolgozását segíti, ha a baktérium-növény kölcsönhatást kísérő folyamatokat vizsgáljuk. A patogén-válasz két típusú lehet, inkompatibilis és kompatíbilis. A támadó kórokozó baktérium a gazdanövényt „gene for gene" kölcsönhatás során felismeri, ami azt jelenti, hogy a domináns avirulencia (avr) géneknek megfelelő domináns rezisztencia (R) gének működnek a növényben. A növényi védekezési mechanizmusok egyaránt épülnek a korai és késői jelátviteli folyamatokra, amelyek nem specifikus, szerzett rezisztenciát biztosíthatnak. Az előzőekben leírt védekezési reakciók mind a fertőzés helyén lejátszódó folyamatokkal kapcsolatosak, pedig ellenállóképesség bekövetkezhet a növény többi, patogénnel közvetlenül nem érintkező szöveteiben is. Ez a szisztematikusan szerzett rezisztencia, amely széles spektrumú védettséget biztosít a növény számára.

A génbeépítés lehetőséget ad a funkciók pontos feltárására, fontos biológiai törvényszerűségek felismerésére. Az így létrehozott tenyészanyagok felhasználásval a rezisztencia-nemesítés is új lehetőségekhez jut.

A vírus- és rovarrezisztencia kialakításában a géntechnológia által bemutatott tudományos és gyakorlati eredményeket a kórokozó gombák esetében még nem lehetett elérni, legalábbis ami a kereskedelmi alkalmazást jelenti. Ennek egyik legfontosabb oka, hogy a gazdanövény és a patogén gombák kapcsolata igen bonyolult, másik a rezisztenciát kialakító folyamatban részt vevő molekulák és gének ismeretének hiánya. Legfontosabb stratégiai cél megismerni a gazda-parazita kapcsolatot meghatározó molekuláris folyamatokat és az abban résztvevő legfontosabb enzimeket, molekulákat. Ide tartoznak: a passzív védelem különböző mechanizmusai, melyek eleve kizárják egyes gombafajok fertőzési lehetőségét. Ilyen a növény és a patogén gombák inkompatibilis kapcsolatának mechanizmusa, mely védetté teszi a növényt a

fertőzés tényleges bekövetkezésével szemben. A növények megakadályozhatják és lokalizálhatják a fertőzést, illetve megakadályozzák a kórokozó terjedését, hidrolizáló és gomba sejtfalát bontó enzimek, a növényi sejtfalat erősítő anyagok, proteináz inhibitorok- termelése által.

Fontos szempont még, hogy a növény, milyen gyorsan ismeri fel a kórokozót és milyen gyorsan képes aktivizálni a védekezési mechanizmusát. A patogén gomba és a növény kapcsolatának ilyen megismerése lehetővé teszi a géntechnológiai stratégia különböző lehetőségeinek pontosítását. Ezek alapján a molekuláris stratégia fő területei lehetnek olyan változtatások a növény fejlődésében, melyek biztosítják a passzív védelmet. Például a kompatibilis kapcsolat inkompatibilissé változtatása a molekuláris jelek módosításával; felismerő faktorok és jelátvivő molekulák azonosítása és a növényi válasz gyorsítása; a gombaellenes fehérjék és gombaellenes anyagok termeltetése vagy túltermeltetése a növény fejlődésének kritikus szakaszaiban.

Sikeres előrelépésként lehet beszámolni a gombaellenes enzimek termeltetéséről vagy túltermeltetéséről. A gombák sejtfala általában kitinből és β-1,3 glükánból áll. A növények különböző enzimeket (kitinázok, glükanázok) termelnek, melyek részei a védekezési mechanizmusuknak. A kitináz gént (*chiA*) baktériumból, gombából és különböző növényfajtákból izolálták (rizs, burgonya, dohány). A kitináz kis mennyiségben termelődik a növényekben, de fertőzéskor mennyisége megnő, és a vakuólumban, illetve a sejtközötti járatokban felhalmozódik. Kitinázt termelő GM növényről több közlemény is beszámol (Chen és mtsai 1998, Bliffeld és msai. 1999, Oldach és mtsai. 2001).

Szintén fontosak azok a gének, melyek a β-1,3-glükanázokat, proteázokat, lipázokat és specifikus gombaellenes lektineket kódolják. Ezért a kilencvenes évek közepén egyszerre több génnel transzformáltak növényeket. A kitináz és glükanáz gének közös konstitutív működtetésével a transzgénikus dohány növények sokkal jobb rezisztenciát mutattak az egygénes konstrukciókhoz képest. Ezt az eredmény paradicsommal végzett kísérletek is megerősítették, melyekben a két gén koexpresszáltatása a *Fusarium*-mal szembeni rezisztencia mértékét már gazdaságilag is értékelhető szintre emelte (Jongedijk és mtsai 2004).

A kilencvenes években fedezték fel a defenzineknek nevezett kis antifungális peptideket. A defenzinek 29-34 aminosavból álló ciszteinben gazdag peptidek, melyek a növényben a kórokozó gombák hifáinak megnyúlását gátolják. A retekből izolált defenzin génnel (*RS-AFP2*) sikerrel transzformálták a dohányt, és a GM dohány ellenállóságot mutatott az *Alternaria longipes* kórokozóval szemben. (Terras és mtsai. 1995).

Király Zoltán professzor több évtizedes kutatásaiból jól ismert az aktív oxigénfajták szerepe és jelentősége a kórokozók okozta tünetek megjelenésében, és újabban a rezisztencia kialakításában. Kísérleteiben a parquat típusú herbicidnek ellenálló növényeken bizonyította, hogy a szuperoxid és egyéb reaktív oxigénfajták káros hatását tűrő növények

rezisztensebbek a gombabetegségekkel szemben is. Eredményeit azzal magyarázta, hogy a különböző kórokozók fertőzésekor kialakuló tünetek összefüggésben vannak a növényben keletkező aktív oxigénfajtákkal, és azok mennyiségével (Király 1972).

Más élő szervezetekben gombaellenes molekulák a GM növényekben is bizonyították hatékonyságukat (pl. tyúktojás lizozim, békabőr eredetű magainin és emlős defenzinek). Felhasználhatóságukat rontja, hogy nagyon kis mennyiségben termelődnek a GM növényi sejtekben.

2.3.2. Géntechnológiai eredmények abiotikus stresszrezisztencia fokozására

A búza nemesítése során fontos cél az abiotikus tolerancia javítása. A búza vízhiánnyal szemben a kevésbé toleráns növényfajok közé tartozik. (Blowers és mtsai 1980). Aszályos időben csak a legfontosabb anyagcsereutak működnek, hogy biztosítsák a túlélést (Dudits 2003).

Vízhiány esetén a növényt stresszhatások érik, melyek gyors és hatékony válaszreakciókat indukálnak a növény szinte minden szervében. A gyökér fiziológiai állapotában változás áll be, ezt molekuláris jelhordozók közvetítik és ennek hatására a hajtástenyészőcsúcs növekedése leáll. A sztómák bezáródnak, a fotoszintézis intenzitása mérséklődik. Rendkívül fontos a szerepe az ABA stressz hormonnak a gyökérből származó jelek közvetítésében (Hartung és mtsai 2002). Az ABA kiemelt szerepe a gyökérsejtek membránjának vízáteresztésének növelése a vízcsatornák szabályozásán keresztül. A nem megfelelő vízanyagcsere a hajtás növekedését korlátozza és alapvető funkcionális zavarokat idéz elő a fotoszintetikus szervesanyag folyamatokban is. Szárazság hatására nő az ABA szintézis a növényben, ami kiváltja a sztómák záródását. A zárósejtekben a turgornyomás csökken, ezáltal a sztóma bezáródik (Hosy és mtsai 2003). A zárósejtek befolyásolják a CO_2 felvételt és a vízvesztés mértékét a sztómák nyitásával, illetve zárásával (Tan és mtsai 2004; Desikan és mtsai 2004; Chaerle és mtsai 2005). A CO_2 koncentráció és a levegő páratartalma egyaránt hatással van a sztómák működésére (Hetherington és Woodward 2003).

A levelekben kialakuló vízhiány anyagcsere változásokat idéz elő, ami nagymértékben befolyásolja az ivarszervek kifejlődését, valamint a fejlődő szemek tartalék tápanyag felhalmozását (Setter és Flannigan 2001). Fejlődő búzaszemekben a vízmegvonás nagymértékben felgyorsította a keményítő felhalmozódást, ugyanakkor lerövidítette a feltöltődési periódus hosszát (Yang és mtsai 2004).

Az ABA által aktivált gének kifejeződésében az ABRE cisz elem kiemelt jelentőséggel bír, mely gyakran másik elemmel közösen vezet génkifejeződéshez (Yoshida és mtsai 2004). Ismert, hogy a növények stresszhatások esetén indukálódó génjeikkel reagálnak. Ilyen stressz-

indukálható géneket és ezek termékeit már azonosítottak és publikáltak. (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki 2003; Yamaguchi és Blumwald 2005).

Bár a mannitol szerepe még nem teljesen tisztázott a stressz toleranciában, számos közleményben beszámolnak a mannitol felhalmozódásának növekedést serkentő hatásáról stresszelt körülmények között. (Tarczynski és mtsai. 1992, 1993). Mannitol-1-foszfát-dehidrogenáz (*mtlD*) génnel transzformált búza növények megemelkedett mannitol akkumulációt követően fokozott szárazság- és sóstressz ellenállóságot mutattak. (Abebe és mtsai. 2003). A LEA (late embryogenesis abundant) fehérjékhez tartozó *HVA1* gén transzformációja és a fehérje túltermeltetése búzában szárazság esetén jobb termést eredményezett évjárattól függően (Sivamani és mtsai. 2000; Bahieldin és mtsai 2005). Fokozott sótűrésről számoltak be Na^+/H^+ *antiporter* géneket fokozottan expresszáló búza transzformánsokkal végzett kísérletek eredményeként (Xue és mtsai. 2004; Wu és mtsai. 2005; Huang és mtsai. 2006).

A szárazsággal sújtott területek közel 40 %-án, savanyú talajokon jelentkező alumínium toxicitás szintén jelentős abiotikus stresszhatásként jelentkezik. A citrát-szintáz vagy malát-dehidrogenáz enzimeket túltermelő transzgénikus növények fokozott alumínium toleranciát mutattak (De la Fuente és mtsai. 1997; Tesfaye és mtsai. 2001; Anoop és mtsai. 2003; Hoekenaga és mtsai. 2006;). Az *ALTM1,* alumínium toleranciát szabályozó gént búzában azonosították Sasaki és mtsai. 2004-ben, árpában való túltermeltetése jelentős ellenállóságot eredményezett (Delhaize és mtsai. 2004).

2.3.3. Géncsendesítés

Kb. egy évtizeddel ezelőtt kiderült, hogy egyes növényi transzgének nem a várt módon viselkednek: az ún. géncsendesítés (gene silencing) jelensége (Matzke és Matzke, 1995) kellemetlen meglepetésként érte a biotechnológusokat. A géncsendesítés a növényben található hasonló bázissorrendű (homológ) DNS, illetve RNS szekvenciákat érinthet. Például egy transzgén és egy növényben meglévő gén közötti szekvencia homológia eredményeként előfordulhat, hogy mindkét gén inaktiválódik, azaz nem fejlődik ki (koszuppresszió). A transzgénikus növényekben kialakuló géninaktiválás súlyos probléma az alkalmazott biotechnológiában: magasabb rendű növényekben egy transzgén kifejeződése akár a független transzformánsok 30%-ában is inaktiválódhat géncsendesítéssel (Grant, 1999).

A géncsendesítés jelenségét ugyan a növényekben fedezték fel (Napoli és mtsai. 1990, Van der Krol és mtsai. 1990), de állatokban és gombákban is megfigyelhető (Fire, 1999, Hammond és mtsai. 2001). A megfigyelések alapján a géncsendesítés két alaptípusa különböztethető meg. Létezik a transzkripciós géncsendesítés (transcriptional gene silencing, TGS), amely géninaktiválás a transzkripció szintjén történik, azaz a célgénből nem keletkezik mRNS. Másik

alaptípusa a poszttranszkripciós géncsendesítés (posttranscriptional gene silencing, PTGS), gén inaktiválás a transzkripció (mRNS képződés) után, azaz a célgén-eredetű mRNS-ek a citoplazmában fokozott mértékben lebomlanak.

2.3.3.1. Indukált géncsendesítés

Az RNS silencing egy alapvető,- minden eukariótára jellemző - védekező, illetve génexpressziót szabályozó ősi mechanizmus. Ez a mechanizmus felelős a genomszerkezet integritásának fenntartásáért, védi a sejtet a különböző molekuláris parazitáktól, vagy idegen RNS-ektől, mint pl. vírusok, transzpozonok, vagy a sejtbe mesterségesen bejuttatott transzgének. Az RNS silencing indukciója során a dsRNS-eket (duplaszálú) a DICER enzimkomplex úgynevezett siRNS-ekre (Small Interfering – si) hasítja. A siRNS-ek olyan 21-24 nukleotid hosszúságú jellegzetes szerkezettel bíró duplaszálú RNS molekulák, amelyek 3' végén 2 bázis túlnyúlik és az 5' végükön foszfát csoportot tartalmaznak. A siRNS-ek az RNS silencing végrehajtó komplexébe, a RISC endonukleáz komplexbe épülnek be, ahol egyszálúvá alakulnak. A RISC felismeri és elhasítja a RISC-be beépült siRNS-sel (guide RNS) komplementaritást mutató mRNS-eket.

A vírusindukált géncsendesítést (VIGS) a növényi sejtben replikálódó vírusok indukálják saját RNS genomjukkal szemben. Ha a vírus genomja idegen szekvencia elemet is tartalmaz (amely homológ egy növényi endogén génnel), akkor az endogén gén mRNS-e is szekvenciaspecifikusan lebomlik és így az endogén gén hiányára jellemző fenotípus alakul ki a növényen. A VIGS ezen tulajdonsága lehetővé teszi, hogy a növények e védekező mechanizmusát felhasználva ismeretlen funkciójú szekvenciákhoz funkciót rendeljünk, vagy adott funkciójú gének funkcióvesztésének hatását vizsgáljuk (Burgyán J. 2006). Kooperációs partnerünk ezt a rendszert alkalmazva választotta ki az Mlo gén jellegzetes szekvenciái közül a búza *Mlo1* szekvenciát, mely vírus indukált géncsendesítés után jelentős lisztharmat rezisztenciát okozott a tesztelt búza növényeken (Burgyán J. és mtsai. még nem publikált eredmények). Ezt a munkát folytattuk a stabil transzformációs géncsendesítési kísérleteinkkel.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer kialakítása

3.1.1. Növényanyag, növénynevelés

Három különböző árpa fajtát (Golden Promise, Steptoe, és Morex) vizsgáltunk vízmegvonási stresszre adott válaszukban. A fajtaválasztásnál figyelembe vettük, hogy a Steptoe aszályérzékeny, a Morex jól tűri a szárazságot. A Golden Promise a Morexhez hasonló adottságú, annak ellenére, hogy nedvesebb klímához alkalmazkodott (skót) fajta. Mindhárom fajta gyakran használt modell genotípus. A tesztrendszer kidolgozásához a laboratóriumunkban leggyakrabban használt Golden Promise fajtát használtuk, mely egyértelműen de mérsékelt DsRed visszaeséssel reagált a stresszhatásra, ezáltal lehetőséget engedett, hogy az RNAi konstrukciók alkalmazásával további csökkenést detektáljunk. A növényeket normál cserepekben, kerti talajba ültettük és klímakamrában neveltük egy hétig, minden kísérlethez azonos felnevelési körülményeket biztosítva. (16 óra megvilágítás, (120 µmol m^2 s-1 a növények szintjén) 8 óra sötét, 55% (nappal) 70% (éjjel) relatív páratartalom, 20°C állandó hőmérséklet).

3.1.2. RNAi konstrukciók előállítása

A célgének szekvenciáit cDNS klónokból PCR technikával, univerzális forward primer és specifikus reverz primerekkel amplifikáltuk. A felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciáját az 1. táblázat tartalmazza. A specifikus primereket a Lasergene (DNASTAR, Madison, USA) számítógépes szoftverrel terveztük meg. A kapott PCR fragmenteket, melyek átlagosan 500 bp hosszúságúak voltak, MinElute 96 UF PCR tisztító plate-ekkel tisztítottuk (Qiagen, Hilden, Germany), majd a pIPKTA38 vektor (Douchkov és mtsai. 2005) SwaI hasítóhelyére ligáltuk. A ligálási reakció termékét *E. coli* TOP10 kémiai kompetens sejtek transzformációjához használtuk, majd ezeket szélesztettük kanamycint (50 µg/ml) tartalmazó LB (Bertani, 1951) táptalajra. Minden klónozási reakcióból egy egyedi kolóniát használtunk fel plazmid DNS izolálásra, amit QIAprep® Miniprep Kittel (Qiagen) végeztünk. A pIPKTA38 klónokban EcoRI emésztéssel ellenőriztük az inszertek jelenlétét.

1. táblázat: A fordítottan ismétlődő szekvenciák PCR amplifikációjához használt oligonukleotid primerek listája.

Clone ID	FORWARD PRIMER	size	REVERSE PRIMER	size	Termék méret (bp)
HO01L05	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	TGTCCATGATCTTGCCCAGT	20	556
HO33D09	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	TGACCTTGACGAACTCCTCG	20	534
HG01K10	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	GGTCGTAGATGCGGTGCTC	19	442
HO10E23	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	TGTGGCAGTCAGAGCCTTTC	20	501
HV09A17	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	GGACTCCTTGGTGTACTGCG	20	572
HR01K17	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	CCTCGAACTCGTTCATGCC	19	529
HO36E09	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	ACGGTGGGGTAGACCTTGAC	20	509
HO16L13	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	GTCCTCGAAAGGATATGCCC	20	594
HZ41I22	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	ATCCCTGGCATGCAACATTT	20	507
HU05J23	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	TTGAGCAGCAACTTCAGCAG	20	548
HS08A22	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	GCGCACTTTCTTCGTCCTTT	20	304
HO32M03	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	GCTTCCTATGGGTTGGGTTG	20	542
HI09P16	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	AGGCTGCGGTACGAGGAG	18	574
HS03E24	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	CAAACTTGATCACGGCAGGT	20	516
HV04I10	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	CCGGGAAGCTTCTCCTTGAT	20	507
HC02P10	CTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG	26	CAGGAGGAAGAAAGGCATGAA	21	534
HQ01K06	TGTTGGGATGGATGCACTGG	20	AGGCTGGAGGGCCTGACAAT	20	504
HU05J23	GTGGATTCCGTGGGGTAAGGCAACG	25	CCCCATCCGGCAAATTGGAGATAGG	25	489
HU05J23	CCTCTCGGTCAGATTGTCGACAGTCCACCC	30	GCCTGCAGGCACAACCCGGGAAAGAACTCGCTC	33	499

2. táblázat: A reverse transzkripciós, real time PCR-hez használt oligonukleotid primerek listája.

Gén	FORWARD PRIMER	bp	REVERSE PRIMER	bp	Termék méret (bp)	Annealing hőmérséklet (°C)
HvHVA1	GCGCAGTACACCAAGGAGTC	20	GGTGGTGGTGGTGTCCTTGA	20	198	60,3
HvDRF1	CTTATGATGAAGCAGCCAGAGCAA	24	TCGGAGTGGTTGGATGTTGTAGTC	24	154	60,3
HvDhn6	GGCGGTAACAAGGAGCAGAC	20	GTGTGCGGCGGGTTGTTCTTG	21	173	60
HvNHX1	GCCCGCGTCGAGCAATG	17	GTGGGTCGGCTTGGTGATGA	20	166	56,8

A pIPKTA38 vektor PCR fragmentjeit a pIPKTA30N fogadó RNAi vektorba rekombináltattuk inverted repeat-ként a Gateway LR clonase felhasználásával (Invitrogen). A teljes 6 µl reakcióelegy tartalmazott 1 µl LR clonase mix II-t, 1 µl pIPKTA30 fogadó vektort (150 ng/µl), 1 µl pIPKTA38 donor vektort és 3 µl vizet. A rekombinációs reakciót egy éjszakán át (overnight) végeztük szobahőmérsékleten (Douchkov és mtsai. 2005), majd 5 µl-t használtunk fel 50 µl kémiai kompetens *E. coli* TOP10 sejtek transzformációjához. A transzformált sejteket ampicillin (100 µg/ml) tartalmú LB táptalajra szélesztettük, majd overnight inkubáltuk 37 °C-on. A plazmid DNS izolálást az LR reakciók egyedi kolóniáiból QIAprep® Miniprep Kittel végeztük. A kész RNAi konstrukciók mindkét inverted repeat-jének jelenlétét EcoRV enzimes emésztéssel ellenőriztük.

3.1.3. Részecskebelövés és a dehidratációs stresszkezelés

Öt, hét napos árpa növénykékről levágott első levelet (kb. 6 cm hosszúságú) helyeztünk 0,5 %-os (W/V) víz-phytoagarra (Duchefa), mely 10 mg/l benzimidazolt tartalmazott a szeneszcencia gátlására. Az arany szemcséket (1 µm átmérő) három különböző vektorból álló plazmid DNS-sel vontuk be. Ezek a pGFP (Schweizer és mtsai. 1999) a normalizáláshoz, a pUbi-DsRed-nos az RNAi hatások értékeléséhez (Panstruga és mtsai. 2003), és a pIPKTA30_Célgén (RNAi vektor) (Douchkov és mtsai. 2005).

Kísérleteinkhez a BioRad PDS 1000/He részecskebelövő berendezést használtuk 900 psi héliumnyomással. Az egyenletes találati eloszlást Hepta adapter felhasználásával biztosítottuk. A belőtt levélszegmenseket zárt Petri-csészékben inkubáltuk klimatizált helyiségben (18 °C állandó hőmérsékleten, természetes, nem közvetlen megvilágítással, 30 µmol m^2 s-1). Ezek a fényviszonyok nagyban csökkentették a lerakott levelek szeneszcenciáját, bármilyen mesterséges megvilágításhoz képest. Kiegészítő megvilágítást alkalmaztunk (Philips TLD 36W) a nappalhosszt 16 órára nyújtva, hogy a gyors levélszeneszcenciát ezzel is kiküszöböljük. A belövést követően 24 órával számoltuk a GFP-expresszáló sejteket Zeiss Axioplan 2 képfeldolgozó mikroszkóppal. A dehidratációs stressz későbbi vizsgálatához a levélszegmenseket filter papírra (Type 813, Macherey-Nagel, Düren, Germany) helyeztük, majd levegőn szikkasztottuk a friss tömeg 60 %-ára, a sresszhatás indítása előtt mért kiindulási friss tömeghez képest (RFW). Ahol indokolt volt, a leveleket még súlyosabb stressznek tettük ki (50-55% RFW). A dehidratációs stresszkezelést a laborban hajtottuk végre 20 °C-on, 40 ± 5% relatív páratartalom, nappali fényviszonyok között, 90 ± 30 percen keresztül. A kontroll leveleket a víz-phytoagaros Petri-csészékben hagytuk. Amint a kezelt

levelek elérték a kívánt RWC szintet a stresszelt leveleket a benedvesített (0,35 ml H_2O/Petri) filter papírra helyeztük 9 cm-es átmérőjű, lezárt Petri-csészékbe. A Petri-csészéket Parafilm®-mel (Pechiney, Chicago, USA) zártuk le, hogy ezzel állandó szinten tartsuk a beállított relatív friss tömeget (RFW) az egész kísérlet időtartama alatt. A stresszelt és kontroll leveleket 4 napon keresztül tartottuk a fent leírt körülmények között. A stresszkezelés végeztével újra lemértük a relatív friss tömeget, majd megszámláltuk a DsRed-expresszáló sejteket a kontroll és stresszelt leveleken, mikroszkóp alatt. Végül kiszámítottuk a DsRed/GFP arányt a stresszelt és kontroll levélszegmenseken.

3.1.4. GFP és DsRed detektálása fluoreszcens mikroszkópiával

Az egyedi sejtek GFP és DsRed fluoreszcenciájának vizsgálata a belövést követően 24 (GFP) és 120 órával (DsRed) történt 'Zeiss Axioplan 2' képfeldolgozó mikroszkóppal, BP450-490 gerjesztő, FT510 fényelosztó, BP515-565 emissziós szűrőkészlet felhasználásával a GFP; BP546/12 gerjesztő, FT580 fényelosztó, BP590 emissziós szűrőkészlettel a DsRed detekcióhoz. A GFP expresszáló sejteket a mikroszkóp egy optikai sávjában vizsgáltuk a levélszegmensek teljes hosszában. A DsRed expresszáló sejteket a teljes belőtt leveleken számláltuk meg.

3.1.5. Transzkript abundancia

A jelölt gének transzkriptjeinek mennyiségi meghatározását reverz transzkripciós, real- time PCR-rel végeztük. Ehhez teljes RNS-t izoláltunk a kontroll és kezelt levelekből a dehidratációs stresszkezelés beállítása után különböző időpontokban. cDNS-t szintetizáltunk a teljes RNS-ből 1 µg DNS-mentes RNS és iScript Synthesis Kit (Bio-Rad, München, Germany) felhasználásával, 20 µl reakcióelegyben. Egy µl cDNS-t templátként használtunk fel a real-time PCR-hez (7900HT Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, USA) QuantiTect SYBR Green Kit (Qiagen) felhasználásával a gyártó cég használati útmutatásait követve, azzal az eltéréssel, hogy a reakcióelegy mennyiségét 10 µl-re csökkentettük. Specifikus primerpárokat a Lasergene (DNASTAR) (2. táblázat) számítógépes szoftverrel terveztük. A transzkript abundancia normalizációjához egy ubiquitin-conjugating enzimet használtunk fel (NUBC, TIGR unigene TC139190 from assembly 9.0). Két biológiai és két technikai ismétlést hajtottunk végre (két független dehidratációs kísérlet, mindkettő esetében két független qPCR futtatás).

3.1.6. A TIGS hatás statisztikai elemzése

A 11. táblázat (lásd: eredmények fejezet) két típusát mutatja a TIGS hatás statisztikai elemzésének, melyet a GraphPad InStat 3 számítógépes szoftver segítségével hajtottunk végre. Először a dehidratációs stresszelt levelek DsRed fluoreszkáló sejtjeinek átlagszámait (a nem stresszelt kontrollhoz normalizálva) hasonlítottuk össze az RNAi tesztkonstrukciók és a pIPKTA30N üres-vektor kontroll felhasználása esetén (páros, két mintás t-próba). Alternatívaként a dehidratációs stresszelt levelek DsRed-fluoreszkáló sejt számának arányát (oszlop_4/oszlop_3) számítottuk ki, a belövés után az RNAi teszt konstrukciókkal vagy az üres kontroll vektorral. A statisztikai szignifikanciát egy mintás t-próbával teszteltük az "1" hipotetikus értékkel szemben. A végső adatok statisztikai elemzésére (rendszerint 10 független kísérlet alapján) az RNAi tesztkonstrukciók kontra üres-vektor kontroll középértékeinek páros, két mintás t-próbáját alkalmaztuk (lásd 8B ábra, eredmények fejezet).

3.2. Stabil genetikai transzformációs kísérletek búzában

3.2.1. Növényi anyag

Növényi anyagnak a hazai szelekciójú, mexikói származású CY-45 tavaszi búza (*Triticum aestivum*. L) genotípust használtunk. Számos búzafajta éretlen embriójának regenerációs képessége alapján (Felföldi és Purnhauser, 1992) a szövettenyésztés során, valamint a kalluszok növekedése, a sejtek embrió és organogenezise tekintetében ez a genotípus bizonyult legalkalmasabbnak in vitro tenyésztésre (Pauk mtsai, 1998). Az alapanyagként használt növényanyagot a GK Kft üvegházában és Szeged, Kecskés-telepi búza tenyészkertjében neveltük, standard nevelési körülmények között.

3.2.2. A kísérletek *in vitro* körülményei

A kalluszindukcióhoz szükséges éretlen búzaszemeket a virágzás utáni 12-14. napon a kalászokból kiszedtük, majd fertőtlenítő oldatban sterileztük. Az izoláláskori sterilezés bizonyos értelemben könnyebben megoldható, mivel az embriók in vivo az ováriumon és a magkezdeményen belül is tulajdonképpen steril körülmények között fejlődnek. Szemek fertőtlenítését 2 %-os NaOCl oldattal, egy-két csepp „Tween 20" nedvesítőszer hozzáadásával végeztük. A búzaszemeket steril desztillált vízzel háromszor öblítettük, lamináris boxban. Az éretlen embriók izolálása steril fülkében sztereómikroszkóp alatt csipesszel és szikével történt. Az izolált CY-45 éretlen búza embriókat Petri-csészékbe

tettük, melyek szilárd D_2 táptalajt (3. táblázat) tartalmaztak. A D_2 táptalaj 2 mg/l 2,4-diklórfenoxi-ecetsavat (2,4-D) tartalmaz, ezzel az éretlen embriók dedifferenciálását indítottuk el és tartottuk fenn. A táptalajra helyezett szövet sejtjei intenzíven osztódtak és ennek segítségével kaptuk a belövéskor már részben differenciálatlan kalluszokat. A génbelövés előtti előtenyésztés 5-10 napig tartott.

3.2.3. A transzformációs kísérletek során használt táptalajok

Az *in vitro* szövettenyésztéshez használt tápközegek általános összetevői a következők voltak: makroelemek, mikroelemek, Fe-Na-EDTA, vitaminok, szerves komponensek, szénforrás, hormonok, szilárdító komponens. 1M KOH-dal állítottuk be 5,8-as értékre a tápközegek pH-ját, ezt követően 20 percen keresztül sterileztük a táptalajt, konyhai kuktában, sterilezést jelző indikátor papír jelenlétében. A táptalajok készítéséhez kereskedelmi forgalomban kapható, „Murashige & Skoog, Basal Salt Mixture" (M0221) és „Murashige & Skoog medium, including vitamins" (M0222) /Duchefa Biochemie/ használatra kész, por alakú táptalajt használtuk fel. Az előtenyésztés, transzformáció, szelekció és növényregeneráció során alkalmazott táptalajok pontos összetételét a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat. A stabil genetikai transzformáció és a növényregenerálás során használt tápközegek összetétele (mg/l).

Komponensek	D_2	D_2m	D_2MCu	D_0Cu 5ppt	D_0 10ppt	$1/2MS_0$ 20ppt
KNO_3	1900	1900	1900	1900	1900	950
NH_4NO_3	1650	1650	1650	1650	1650	825
$CaCl_2x2H_2O$	440	440	440	440	440	220
$MgSO_4x7H_2O$	370	370	370	370	370	185
KH_2PO_4	170	170	170	170	170	85
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,415
H_2BO_3	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	3,1
$MnSO_4x4H_2O$	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	11,15
$ZnSO_4x7H_2O$	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	5,25
$Na_2MoO_4x2H_2O$	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
$CoCl_2x6H_2O$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125
$FeSO_4x7H_2O$	27,85	27,85	27,85	27,85	27,85	13,925
Na_2EDTA	37,25	37,25	37,25	37,25	37,25	18,125
Myo-Inositol	100	100	100	100	100	50
Nikotinsav						0,25
Piridoxin-HCl						0,25
$CuSO_4x5H_2O$			2,5	2,5		
Thiamin-HCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
2,4-D	2	2	2			
Mannitol		63700				
Glicin						1,0
Maltóz			30000			
Szacharóz	30000	30000		30000	30000	20000
Gelrite	2800	2800	2800	2800	2800	2800
Glufosinate-ammonium				5	10	20
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

3.2.4. A genetikai transzformáció körülményei

A génbelövési sorozat elvégzése előtt az alábbiakban ismertetett előkészületeket tettük meg. Az éretlen, izolált búzaembrió volt a kiindulási anyagunk a génbelövéshez, amely egyhetes kalluszosodáson esett át. A részecskebelövést BioRad® PDS1000/He génpuskával végeztük, amelynek működési alapja a héliumgáz meghajtás. A berendezés technikai paramétereinek beállítása a sikeres transzformációhoz elengedhetetlen. Ehhez a cég által, a használati utasításban megadott iránymutatást használtuk.

3.2.5. A DNS-oldat elkészítéséhez szükséges oldatok:

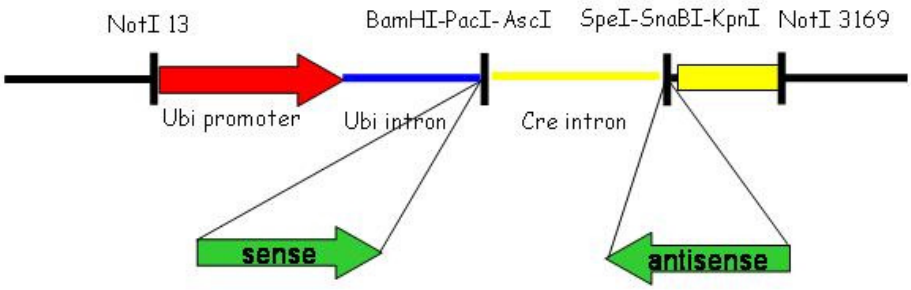
- steril desztillált víz (Millipore, Elix®).
- abszolút etanol (Merck).
- 70%-os etanol (70% abszolút etanol [Merck] + 30% Millipore, Elix®).
- vízzel hígított, kuktázással sterilezett 2,5 M $CaCl_2$: (m_w=147g/mol).
- vízzel hígított 0,1 M spermidin (m_w=254,6g/mol).
- plazmid-DNS

3.2.6. Alkalmazott plazmid vektorok

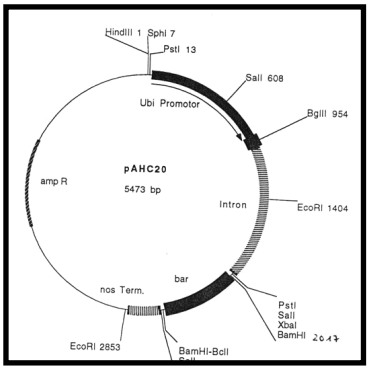
Búza növényeinkben az Mlo gén elhallgattatására kooperációs partnerünk (Dr. Várallyay Éva MBK, Gödöllő) speciális vektor molekulát, a pSTARLING-A (Wesley és mtsai. 2001) konstrukciót használta, melybe szensz és antiszensz orientációban építette be a búza genomjában elhallgattatni kívánt génre tervezett szekvenciákat (1. ábra). Mivel a pSTARLING-A plazmid molekula nem tartalmaz szelektálható marker gént, ezért a géncsendesítésért felelős plazmidunkat együtt transzformáltuk egy *bar* gént hordozó, pAHC20 (Christensen mtsai. 1992) plazmid molekulával. A kotranszformáció során a pSTARLING-A és pAHC20 plazmid molekulákat használtuk fel, a 4. táblázatban felsorolt mennyiségi arányban.

4. táblázat. Az Mlo géncsendesítési kísérletek során az együtt transzformált plazmidok mennyisége, a hígításhoz használt etanol és az egyes kísérletekben transzformált embriók mennyisége.

pSTARLING-A (µl)	pAHC20 (µl)	Előkészítés (µl etanol)	Belőtt embriók (db)
3	3	84	950
5	5	84	925
4	4	84	1000
4	4	150	775

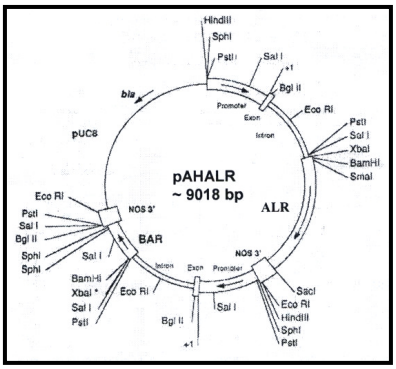


1. ábra. A pSTARLING-A plazmid molekula sematikus felépítése (Dr. Várallyay Éva nyomán, MBK, Gödöllő).



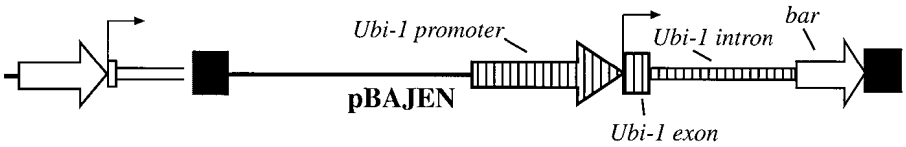
2. ábra. Transzformációnk során alkalmazott pAHC20 plazmid molekula sematikus térképe (Christensen mtsai. 1992).

A lucernából (*Medicago sativa* L.) izolált aldóz-reduktáz (*MsALR*) gént lucernából izolálták az SzBK Növénybiológia Intézetében (Mai Antal és Fahriye Ertugrul). Az *MsALR* gént pAHC25 plazmid molekulába építették be, a *GUS* gén helyére. Az így kapott plazmid molekula térképét a 3. ábra mutatja, amelyben a célgént (*MsALR*) kukorica ubiquitin (ubi1), a szelekciós marker gént szintén a kukorica ubiqutin promóter működteti. Az aldóz-reduktáz génnel történő transzformáció során ezt a vektormolekulát használtuk.



3. ábra. A pAHALR nevű plazmidot, a pAHC25 plazmid molekula felhasználásával készítették az SZBK-s együttműködő partnereink (Mai Antal, Fahriye Ertugrul).

Az NBS-LRR típusú rezisztencia analóg gének transzformációjához a pBAJEN (Ahlandsberg és mtsai. 2001) plazmidot használtuk fogadó vektorként. A génizolálási stratégia: a célgének teljes hosszúságú cDNS-ét izolálta együttműködő partnerünk (Dr. Dallmann Géza MBK, Gödöllő) specifikus, az ATG és Stop kódokat magában foglaló primerekkel, RT-PCR felhasználásával. Az amplifikálást követően a gélből izolált fragmenteket pGEM Easy-T vektorba klónozta és szekvenálta. Végső lépésként búza transzformálásra alkalmas /pBajen/ vektorba építette be a megfelelő cDNS fragmentumokat. Ezt követően a génizolálás eredményeként összesen hét különböző NBS-LRR típusú klónt állított elő együttműködő partnerünk. Mind a hét transzformációs kísérletben (361, 362, 363, 371, 373, 25.4, 15.1 klón) a pBajen vektorba építettük a rezisztenciagén szekvenciáját.



4. ábra. A pBajen vektor molekula sematikus ábrája (Ahlandsberg és mtsai. 2001)

3.2.7. A DNS-oldat elkészítése a belövéshez

A részecskebelövő berendezés, génpuska berendezéseit fertőtlenítettük. Az előző pontban ismertetett anyagokat az oldatkészítés ideje alatt jégen hűtöttük

A folyamatot a következők szerint végeztük:
Arany részecske előkészítése a belövéshez (20-25 lövés, végig jégen):

1. 60 mg aranyat mértünk ki 1,5 ml-es Eppendorf csőbe.
2. 1 ml abszolút etanolt adtunk hozzá.
3. 3 percen keresztül kevertük (Vortex) maximális fordulatszámon.
4. 2 percig centrifugáltuk 14 000-es fordulaton, a fölülúszót eltávolítottuk.
5. 1 ml etanolt adtunk hozzá, majd a 3-4. lépést megismételtük.
6. Újabb 1 ml etanolt adtunk hozzá.
7. Felhasználásig -20 °C-on tároltuk (azonnali használatkor jégre tettük).
8. Vortex-el kevertük 3 percig, maximum fordulaton, ultrahangos vízfürdőben szuszpendáltuk felhasználás előtt.

Az előkészített szövetek belövésekor az alábbi protokollt követtük a PDS 1000/He részecskebelövő készülékkel:

1. 30 µl arany szuszpenziót raktunk 0,5 ml-es Eppendorf csőbe.
2. 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk.
3. 50 µl steril vízzel (Millipore), kevertük (Vortex), majd ultrahangos vízfürdőben szuszpendáltuk.
4. 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig centrifugáltuk, a fölülúszót eltávolítottuk.
5. 55 µl steril vízzel kevertük (Vortex), majd ultrahangos vízfürdő következett.
6. Plazmid hozzáadása a mintákhoz: 3-3 µl, 5-5 µl vagy 4-4 µl, (4. táblázat) 1µg/µl koncentrációjú pSTARLING-A, pAHC20 plazmid DNS-t adtunk hozzá, Vortex-el kevertük közepes fordulaton 1 percig.
7. Hozzáadtunk 20 µl (0,1 M) spermidint.
8. Hozzáadtunk továbbá 50 µl $CaCl_2$-ot.
9. Megkevertük Vortex-el közepes sebességen.
10. Centrifugáltuk ugyancsak 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig, ezután a fölülúszót eltávolítottuk.
11. Hozzáadtunk 200 µl abszolút etanolt.
12. Ismét centrifugáltuk 14000-es fordulaton 1-2 másodpercig, fölülúszót eltávolítva.
13. 84 vagy 150 µl abszolút etanolt adtunk hozzá. (Lásd 4. táblázat)
14. Makrohordozónként 3,5 µl előkészített szuszpenziót adagoltunk, egyenletesen szétkenve középre, így nagyon finom filmréteget kaptunk a hordozó korongokon.

Az arany szélesztését követően nem tartottunk várakozási időket. A kiadagolás ötösével történt.

15. A belövést 1100 psi He nyomás és -27,5 Hgmm vákuum beállításával végeztük.

3.2.8. A búza genetikai transzformációjának lépései

Transzformáció előtt 4-6 órával az egyhetes búza kalluszokat magas mannitol tartalmú, ozmotikus, D_2m táptalajra raktuk át. Körülbelül egy nappal (20-24 óra) a transzformáció után D_2MCu kalluszindukciós táptalajra kerültek. Ezen a táptalajon tartottuk sötétben, 10-14 napig 24-25 °C-os termosztátban. Ezt követően a kalluszok normál méretű Petri-csészében lévő, hormonmentes D_0Cu 5ppt, regenerációs táptalajra kerültek, ahol két hétig voltak fényen 24-25 °C-on. Újra regeneráló táptalajra kerültek 10 mg/l-re emelt glufosinate-ammoniummal, emelt dózisú $CuSO_4$ nélkül, ahol két hétig voltak fényen, 24-25 °C-on.

Végül a regenerált növénykéket (2 cm fölött) gyökereztető táptalajra helyeztük, 1/2 MS, 2% szacharózzal és 20 mg/l glufosinate-ammoniummal. Ez a táptalaj már üvegcsövekben volt. Itt neveltük a növénykéket 24-25 °C-on, fényen.

A megfelelően meggyökeresedett növényeket közönséges (nem steril) talajba ültettük ki zárt rendszerű üvegházi körülmények közé, alulról nyitott, 6 cm átmérőjű PVC csövekbe. Frissen kiültetett növénykéket 3 napig kisméretű, átlátszó polietilén, izoláló zacskóval egyedenként takartunk, így védtük az erős párolgástól. A nyári meleg miatt rendszeres párásításról gondoskodtunk az üvegházban. A fóliarakást igény szerint, fokozatosan távolítottuk el a növényekről. A megfelelően fejlődő, megerősödött növényeket két hét után 1%-os Finale 14 SL totális gyomirtó szerrel permeteztük. Egy hét után a zölden maradt növényekből DNS-t izoláltunk.

3.2.9. DNS izolálás növényi mintákból

3.2.9.1. Előkészületek

- Steril Eppendorf csövek
- Steril pipettacsúcsok
- Steril oldatok
- 65 °C fokra felfűtött termomixer
- Extrakciós oldat

3.2.9.2. Genomi DNS izolálása

Az izoláláshoz a PURGENE Genomi minirep protokollt használtuk.

1. A DNS izoláláshoz 10-30 mg friss levélmintát steril 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztük, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és Vortex segítségével, homogenizáló, rozsdamentes, acél vagy üveg rúd segítségével eldörzsöltük.
2. 300µl Cell Lysis Solution-t adtunk, amelybe 1.5 µl (10 mg/ml) RNase-t adagoltunk minden mintához.
3. 1 órás, 65 °C-on fokon inkubáció következett, majd mintáinkat az inkubáció közepénél és a végénél megkevertük tízszer átfordítva.
4. A mintákat lehűtöttük szobahőmérsékletre.
5. Hozzáadtunk 100 µl Protein Precipitation Solution-t a mintákhoz.
6. 20 másodperc keverés Vortex-el, magas fordulatszámon
7. Ezután 3 percig centrifugáltuk, maximum fordulatszámon.
8. A felülúszót új, steril Eppendorf csőbe mértük és 300 µl 100%-os isopropanolt adtunk hozzá, mellyel kicsaptuk a benne levő DNS-t.
9. Óvatosan megkevertük a mintákat 50-szer átfordítva.
10. 1 percig centrifugáltuk 13.000 rpm fordulaton.
11. A felülúszót alaposan eltávolítottuk és hozzáadtunk 300 µl 70%-os etanolt.
12. 1 perc centrifugálás következett, 13.000 rpm fordulaton, majd alaposan eltávolítottuk az etanolt.
13. Steril boxban történő 5-10 perces szárítás következett.
14. Utolsó lépésként 50 µl DNA Hydration Solution hozzáadása következett.

3.2.10. PCR reakciók

A genetikai transzformációs kísérletek során a célgének és a szelekciós markergén jelenlétének DNS szintű bizonyításához az adott génre specifikus PCR reakciókat hajtottunk végre. Az 5. táblázat mutatja a PCR reakcióelegy 20 µl térfogatára számított összetevők mennyiségét. A PCR reakcióelegy összeállításánál a Fermentas® 2X Master Mixet használtuk fel.

5. táblázat. A PCR reakcióhoz használt reakcióelegy összetevői 20 µl végtérfogatban felvéve.

Anyag	Bemérendő mennyiség (µl)	Végső koncentráció
2X PCR Master Mix	10	1x
Primer	1	0,1-1 µM
Primer	1	0,1-1 µM
Templát DNS	1	10 pg-1 µg
Víz	7	

A specifikus PCR reakciókhoz a 6. táblázatban felsorolt oligonukleotid primereket használtuk, melyeket a Primer Premier 5.0 számítógépes szoftverrel terveztünk.

6. táblázat. A stabil transzformációs kísérletek során használt oligonukleotid primerek.

Célgén	Elnevezés	Szekvencia
Mlo1 szensz	pST_ubi1768s (forward)	GCAGCATCTATTCATATGCTC
Mlo1 szensz	TaMLO1681PacIas (reverse)	ATGTTAATTAATTGTATTTCTTATTGTACGAATCATC
Mlo1 antiszensz	pST_crei_1036s (forward)	CAGTAGAGAACTAGGTTTAGGGC
Mlo1 antiszensz	TaMLO1561KpnIs (reverse)	ATGGGTACCGATGCCGACATCCCCAGCGCAGA
Bar	Bf5 Br6	CGAGACAAGCACGGTCAACTTC AAACCCACGTCATGCCAGTTC
361; 362	BajMGSFor BajMGSRev	CTGCTGCTTCGTCAGGCTTAG GCTGTTCAGGTTCCTCCGTGT
363	BajNBFor BajNBRev	CCTCAGCATTGTTCATCGGTAG AAACGAGCCAAGATTTCCAGT
15.2	OSF1 OSR1	ATGGTCGAGATTGTGACGGGC ATACCTTCTCCAGCTCCATTGTAGG
25.4	OSF2 OSR2	ATGGCGGCGGTATTAGATGCTTTG CACTCTCTAGGCCACGTGTAGACATCC

A 7. a-f táblázatban tüntettük fel a specifikus PCR reakciók során alkalmazott programokat, a ciklusok alatt beállított hőmérsékleteket és időtartamokat.

7. a táblázat. Mlo PCR program:

A reakció lépései:	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	95°C	3′
2. ciklus: 35x	95°C	30″
	55°C	30″
	72°C	1′
3. ciklus: 1x		
	72°C	7′
4. ciklus	4°C	∞

7. b táblázat. A *bar* PCR program.

A reakció lépései:	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	95°C	4′
2. ciklus: 30x	95°C	30″
	61.7°C	30″
	72°C	30″
3. ciklus: 1x	72°C	5′
4. ciklus:	4°C	∞

7. c táblázat. NBS-LRR PCR program a *T. monococcum* eredetű, szensz orientációban plazmidba épített inszertekhez (361, 362, 363).

A reakció lépései:	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	94°C	3′
2. ciklus: 35x	94°C	″
	58°C	″
	72°C	″
3. ciklus: 1x	72°C	′
4. ciklus:	4°C	∞

7. d táblázat. NBS-LRR PCR program az antiszensz orientációban plazmidba épített inszertekhez (371, 373).

A reakció lépései:	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	94°C	3′
2. ciklus: 30x	94°C	30″
	54°C	40″
	72°C	1′
3. ciklus: 1x	72°C	6′
4. ciklus:	4°C	∞

7. e táblázat. NBS-LRR PCR program az *Oryza sativa* L. eredetű NBS-LRR génekhez (25.4, 15.2).

A reakció lépései:	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	94°C	3′
2. ciklus: 30x	94°C	30″
	57°C	30″
	72°C	1′
3. ciklus: 1x	72°C	7′
4. ciklus:	4°C	∞

7. f táblázat. MsAlr PCR program.

A reakció lépései:	Hőmérséklet	Idő
1. ciklus: 1x	95°C	2′
2. ciklus: 30x	95°C	30″
	64°C	30″
	72°C	1′
3. ciklus: 1x	72°C	10′
4. ciklus:	4°C	∞

3.2.11. Gélelektroforézis

A kapott PCR termékeket agraróz-gélben (1,5%), elektroforézissel ellenőriztük (120 mA áramerősségnél). Az agaróz gélbe ethídium-bromidot (1 μg/ml) adagoltunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A génexperessziós tesztrendszer kidolgozásának előzményei

Napjaink funkcionális genomikai kutatásai megkövetelik a gének nagy mennyiségű vizsgálatát. Az eddig ismert nagyteljesítményű tesztrendszerek mellett szükségesnek tartottuk egy olyan vizsgálati módszer létrehozását, amely amellett, hogy szintén nagy, vagy legalább közepes teljesítményű, adatot szolgáltat a vizsgált gének ozmotikus stressztűrésben betöltött szerepéről. A tesztrendszerrel vizsgálni kívántuk, hogy az érintett géneknek valóban van-e élettani funkciója a beállított stresszhatást tekintve, illetve túltermelése vagy kikapcsolása valóban csak a kiváltott stresszhatás esetén nyilvánul-e meg. Rendszerünk kialakítását több, módszertanilag előremutató, de a végső felhasználhatóságot tekintve sikertelen kísérlet előzte meg. E kísérletek sok tanulsággal szolgáltak a további tesztek kialakításakor.

Az első kísérletek búza sejtszuszpenziós tenyészetek GFP markergénnel történő transzformációjára irányultak. Elgondolásunk szerint a szilárd táptalajra kiszélesztett búza sejteket a markergénnel és a célzott markergénre specifikus RNAi konstrukciókkal lőttük be, hogy megvizsgáljuk, PEG kezelés közben hogyan változik a sejtek osztódása. Első lépésben a kontroll, nem stresszelt és PEG kezeléssel dehidratált tenyészeteket pGFP, zöld fluorescens fehérjét túltermeltető konstrukcióval transzformáltunk. A belövést követően 24 órával mikroszkópos vizsgálattal detektáltuk és számláltuk meg a GFP-t expresszáló sejteket, majd naponta (24 óránként) ellenőriztük a zölden fluoreszkáló sejtek osztódását a kontroll és PEG tartalmú táptalajon. Várakozásunknak megfelelően a 400 mOsmol értékre beállított táptalaj hatékony és elegendő stresszhatást jelentett a búza sejtszuszpenziók számára. A kontrollkezeléshez képest jelentősen csökkent a tenyészeteink frisstömeg gyarapodása a vizsgált stresszhatás alatt. Kísérleti terveink szerint a mikroszkópos vizsgálattal ellenőriztük a GFP markergénnel transzformált búza sejtek osztódását. A kontroll és a PEG kezelt tenyészetek között jelentkező jelentős osztódásbeli különbséget az RNAi konstrukcióval történő együttes transzformáció feltehetően, bizonyos célzott gének esetén tovább módosítaná. Az elvégzett kísérletek eredményei ezt az elgondolásunkat se megerősíteni, se cáfolni nem tudták, mivel a markergénnel jelzett sejtek osztódása gyakorlatilag követhetetlen volt a kívánt időintervallumban. A tranziens GFP expresszió 4-5 nap elteltével egyes sejtekben megszűnt illetve az intenzíven osztódó sejtkolóniák elfedték a transzformált sejtjeinket. Az osztódó sejtekben, sok esetben kétséges volt, hogy valódi osztódásról van e szó, vagy csupán egymás

melletti függetlenül transzformált sejtekről. A szilárd táptalajra szélesztett búza sejtek osztódó képességét ezen kívül döntően befolyásolta a sejttenyészet kora, az utolsó passzálás óta eltelt idő, de főleg a kiszélesztett sejtek mennyisége. Ezen eredmények tükrében elvetettük a búza sejtszuszpenziós tenyészetek felhasználását, mint lehetséges inokulumot a géntesztelési rendszer kialakítására.

A következő kísérleti elgondolás szintén nem hozott eredményt, de lényegében elvezetett a működő és végrehajtható rendszer kidolgozásához. A búza folyékony közegben tenyésztett sejtszuszpenzió helyett egyhetes árpa csíranövényeket vontunk be a kísérletbe. A hatékony stresszhatást gyökéren keresztül alkalmazott PEG kezeléssel biztosítottuk. A GUS génnel normalizált, anthocyanin akkumuláló sejtek számának csökkenése hatékonyan jelezte az egyedi epidermisz sejteket érő vízhiány súlyosságát. A GUS és anthocyanin termelődésért felelős gén együttes transzformációja, majd expressziója a transzformált sejtekben ideálisnak tűnt. A GUS transzformációt követő tranziens expresszió már a belövést követő 24 órával bekövetkezett, valamint 4-5 napos stressz-periódust követően is biztonsággal detektálható volt. Az anthocyanin expressziója és vörös színanyaggá történő érése lényegesen több időt vesz igénybe. Feltételezésünk szerint, ez a komplex rendszer érzékeny a sejtet érő károsító hatásokra. Kísérleteink igazolták feltevéseink helyességét. A gyökéren keresztül biztosított stresszkezelés és ennek négy napon keresztüli fenntartása bonyolult és túlzottan munkaigényes eljárásnak bizonyult. Ennek ellenére a kapott eredmények az alábbiakban részletesen bemutatott tesztrendszer kidolgozásához jó alapot szolgáltattak.

4.1.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer egyedi génfunkció vizsgálatára vízmegvonással stresszelt árpában

A szárazságtól vagy dehidratációs stressztől szenvedő sejtek potenciálisan sérülnek membrán integritásukban, a fehérjék szerkezetében és a redox státuszukban, hogy csak néhányat említsünk a felmerülő legjelentősebb problémák közül (Ingram és Bartels 1996). Kísérleteinkben felhasználtuk a vörösen fluoreszkáló DsRed fehérje biokémiai tulajdonságait, hogy megismerjük és jelezzük a szárazság stressz tényét, súlyosságát, a belőtt árpa epidermisz sejtekben. A DsRed fehérjéről korábban kimutatták, hogy fluoreszcens homo-tetramer komplexszé való éréséhez néhány nap szükséges állati és növényi rendszerekben és denaturáció esetén vörös fluoreszcenciából gyenge zöld fluoreszcenciára vált át (Baird és mtsai. 2000, Gross és mtsai. 2000). Ezek alapján valószínűnek tűnt, hogy a DsRed fluoreszcenciája érzékeny azokra a denaturáló feltételekre, melyek a négy napos súlyos stressz periódus alatt jelentkeztek. Ráadásul a megnövekedett proteolitikus aktivitás és sejthalál is csökkenti a működőképes, fluoreszcens DsRed mennyiségét. A belövést követően beállított vízhiány-stressz miatt károsodott illetve megváltozott

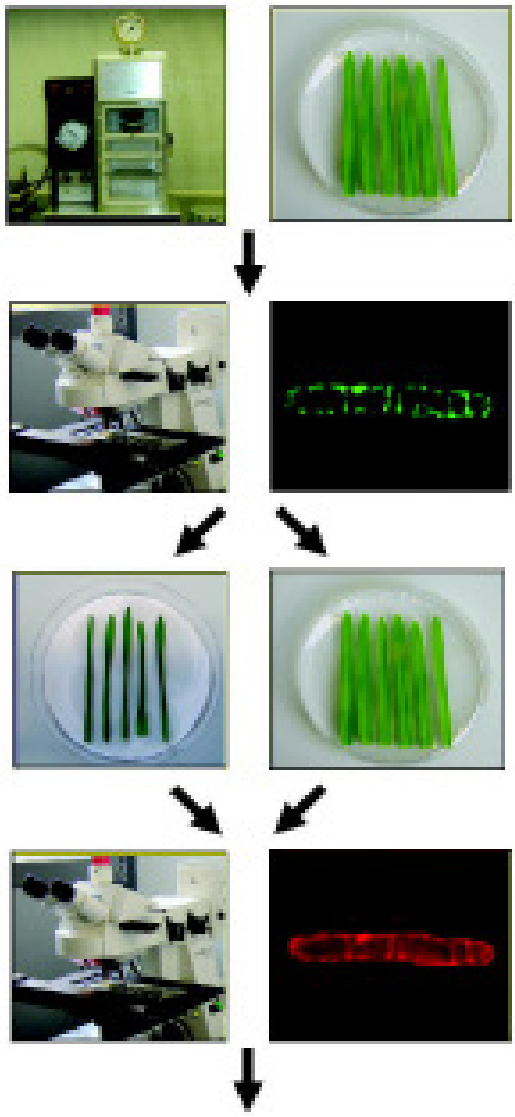
anyagcseréjű levelekben a fehérje komplex vegyületté alakulása sok esetben nem ment végbe, károsodást szenvedett. A korábbi kísérletek tapasztalataira alapozva a teljesítmény fokozása érdekében növényekről levágott levelek vizsgálatával folytattuk a rendszer kialakítását. Egyedi sejtek vizsgálatára alkalmasnak találtuk az egyhetes növényekről leválasztott első levélen történő tesztelést. A szeneszcencia elkerülésére maximum egy hetes időtartamra eredményes volt a vizes agarhoz adagolt benzimidazol. A korábban kipróbált PEG kezelés helyett a természetes körülményeknek jobban megfelelő vízmegvonást alkalmaztuk. Az 5. ábra összefoglalja a leválasztott levelek dehidratációs tolerancia tesztjének kísérletét, mely három plazmid egyidejű belövésén alapszik: a zöld fluoreszcens fehérjét kódoló pGFP a DsRed fluoreszcencia belső normalizálására, Ubi-DsRed-nos riporterként a sejt dehidratációs stressz állapotának jelzésére és a pIPKTA30_Célgén az árpa jelölt gének RNAi csendesítésére. Az RNAi konstrukció helyett túltermeltető konstrukciók is használhatók.

1. Kotranszformáció a DsRed-GFP- expressziós, valamint RNAi konstrukciókkal.

2. GFP expresszáló sejtek számlálása a 24 órával a transzformációt követően.

3. Kiszárítás a relatív friss tömeg 60%-ára és a stressz fenntartása 96 órán át.

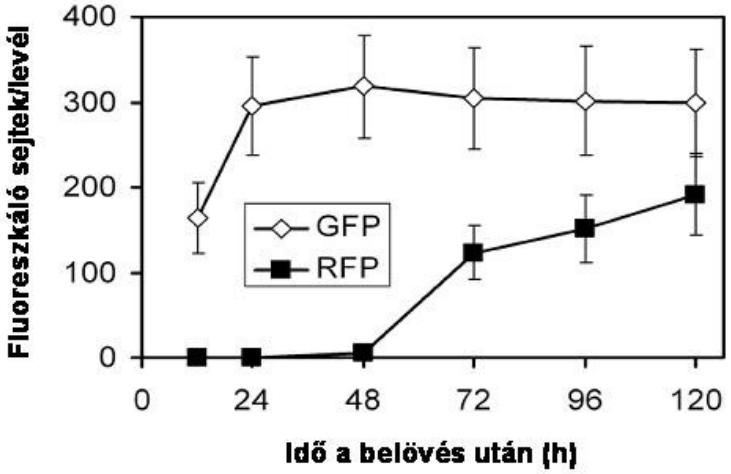
4. DsRed-t kifejező sejtek megszámlálása, 120 órával a belövést követően.



DsRed/GFP arány kiszámítása a turgoros és vízhiány stresszelt levélszegmenseken.

5. ábra. A TIGS szűrő rendszer folyamatábrája, gének funkciójának értékelésére, dehidratációval stresszelt árpa levelekben.

A belövés után a GFP-t, az éretlen (nem fluoreszkáló) DsRed fehérjét, valamint a kettős szálú RNS-t 24 órán keresztül hagytuk felhalmozódni nem stresszelt körülmények között. A 6. ábra mutatja, hogy a GFP fluoreszcencia 24 órával a belövés után kifejeződött, amíg - mint az várható volt - a DsRed fluoreszcenciája négy nap után még mindig növekedett.



6. ábra. A tranziens GFP és DsRed kifejeződés kinetikája a transzformált epidermisz sejtek fluorescenciája alapján. Ugyanazon belőtt leveleken számoltuk ismételten a zöld és a vörös epidermisz sejteket a jelzett időpontokban. Öt levélszegmens átlaga ± középérték hibaszórása

A GFP expresszáló epidermisz sejtek számlálása után a levélszegmensek 50%-át tettük ki dehidratációs stressznek úgy, hogy kiindulási érték 60%-ára csökkentettük a relatív friss tömegüket (RFW). A levelek fennmaradó 50 %-át, mint nem-stresszelt kontrollt kezeltük és vizes agaron tartottuk turgoros állapotban. Minden belövés esetén, ahol az RFW-t a stresszkezelés kezdetén 60%-ra állítottuk be, az RFW 66,4 ± 9,3%-ra (átlag ± SD, n=111) növekedett a stresszkezelés ideje alatt, jelezve a viszonylag állandó, reprodukálható stresszkezelési feltételeket.

Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a levelek relatív friss tömegét (RFW) és relatív víztartalmát (RWC) - mely a szárazságstressz széles körben használt mutatója (Barrs és Weatherley 1962) - kiszámítottuk a relatív víztartalmat is. A 8. táblázat mutatja, hogy a kísérleti körülményeket úgy választottuk meg, hogy 60%-os relatív víztartalom felelt meg a súlyos szárazság hatásnak a stresszkezelés négy napja alatt (Teulat és mtsai. 2003).

8. táblázat. A transzformált árpa levelek relatív friss tömege (RFW) és a relatív víztartalma közötti összefüggés.

	kontroll[a]	dehidratált[b]
RFW[c] 4 nap után	101,3 ± 0,22[e]	69,8 ± 1,3[e]
RWC[d] 4 nap után	97,0 ± 0,1[e]	60,1 ± 0,5[e]

[a]0,5% víz- Phytoagaron négy napig inkubált levélszegmensek lezárt Petri-csészéken
b60% relatív friss tömegre dehidratált levélszegmensek nedvesített szűrőpapíron inkubálva, zárt Petri-csészékben
[c]Relatív friss tömeg (RFW)(%)= (FW4nap/FWkiindulási) x 100
[d]Relatív víztartalom (RWC) (%)=(FW4nap-DW)/(TW-DW) x 100; DW - száraz tömeg - levélszegmensek 24 h 65°C-on szárítva, TW - turgescens tömeg – levélszegmensek 24 h, 20°C-on.
[e]Átlag ± középérték hibaszórása, öt belövés pGFP, pUbiDsRed-nos és pIPKTA30N üres RNAi vektorral

A dehidratációs stresszkezelés végeztével számláltuk meg a DsRed fluoreszkáló sejteket, majd normalizáltuk az ugyanazon leveleken a stresszkezelés előtt számolt GFP fluoreszkáló sejtek számával. Annak megállapításához, hogy a DsRed megfelelő-e a dehidratációs stressz jelzésére, meghatároztuk három különböző árpa genotípus normalizált DsRed fluoreszcenciáját vízmegvonás hatására. A ’Golden Promise’ és a ’Morex’ fajta esetén enyhe, míg a ’Steptoe’ fajta esetén a DsRed fluorescenciájának erős csökkenését tapasztaltuk (9. táblázat).

9. táblázat. DsRed fluoreszkáló sejtek számának csökkenése a levél szegmenseken, vízmegvonás alatt, különböző árpa fajtákban.

Fajta	DsRed (stresszelt/kontroll)[a]	p (t-test)[b]	n[c]
Golden Promise	0,84 ± 0,03	<0,0001	30
Steptoe	0,54 ±0,06	0,0017	5
Morex	0,86 ±0,09	0,18	5

[a]DsRed fluorescens sejtek számának aránya kiszáradás stresszelt és kontroll levél szegmensekben. Középérték ± középérték hibaszórása
[b]Egymintás t-próba '1' hipotézisértékhez képest
[c]Független belövések száma

A 'Steptoe' fajtánál a 'Morex'-hez képest észlelt erősebb visszaesés összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a 'Morex' csíranövények erősebb, vigorosabb kezdeti fejlődést mutattak 15% PEG jelenlétében (K. Neumann, IPK, személyes közlés). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a normalizált DsRed fluoreszcens sejtek számának csökkenése megbízhatóan jelezte a vízmegvonás hatását a belőtt epidermisz sejtekben. Mindazonáltal további tesztelésre volt szükség annak eldöntésére, hogy mely árpa genotípus lesz legalkalmasabb a jelölt gének tesztelésére a TIGS rendszerben. A 'Golden Promise' fajtát használtuk a további kísérletek során, mely csak mérsékeltebb csökkenést mutatott a DsRed fluoreszkáló sejtek számában dehidratációs körülmények között, annak ellenére, hogy eredetileg nedves körülményekhez alkalmazkodott (UK). Ez azt sugallta, hogy a fontos gének tranziens elcsendesítése a 'Golden Promise' fajta erőteljes dehidratációja esetén is követhető DsRed csökkenést eredményezett.

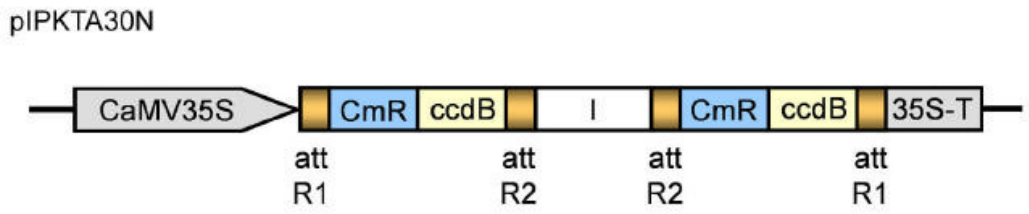
4.1.2. Jelölt gének tranziens indukált géncsendesítése (TIGS)

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a TIGS rendszer használhatóságát vízmegvonással stresszelt levelekben, irodalmi adatok alapján összeállítottunk egy listát a stressz válaszban feltételezhetően részvevő génekről. A 16 gén listáját mutatja a 10. táblázat. A lista 14 olyan gént is tartalmaz, melyek expressziós adatok vagy mutáns illetve transzgénikus növényekre vonatkozó adatok alapján szerepet játszhatnak a szárazságtoleranciában (lásd a 10. táblázatban). Ezen kívül a listán szerepel - negatív kontrollként - két olyan gén, melyek valószínűleg nem játszanak szerepet az abiotikus stressz toleranciában.

10. táblázat. Árpa dehidratációs stresszben feltételezhetően szerepet játszó jelölt gének, melyeket tranziens indukált géncsendesítési rendszerben (TIGS) teszteltünk, a 'Golden Promise' fajtával.

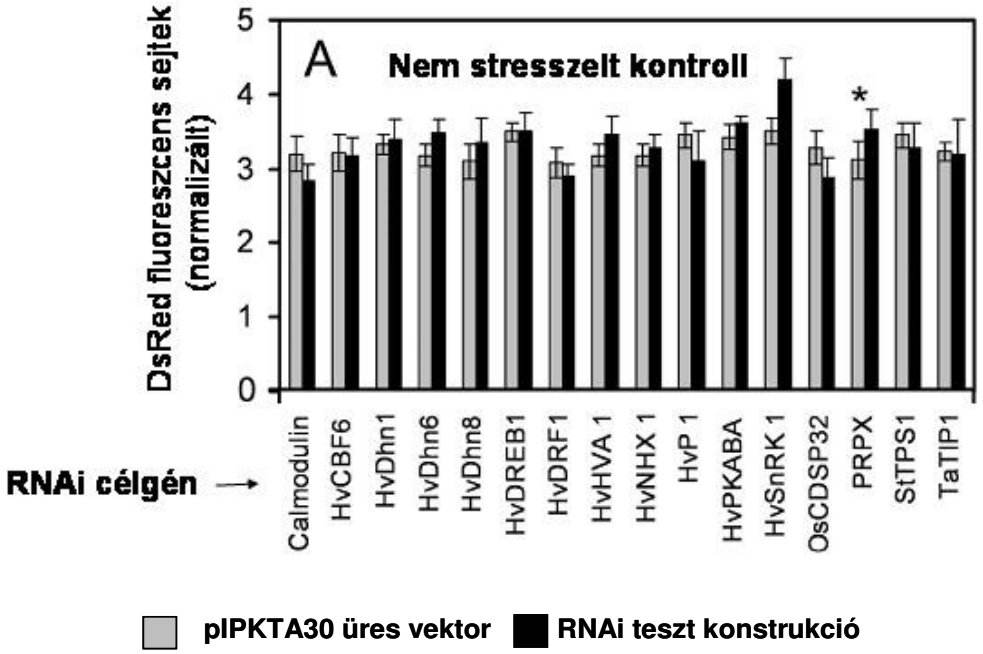
Clone ID	Funkció	BlastX találat (NCBI)	E-value	Azonosság	Acc. Nr.	Meg-jegyzés	Hivatkozás
HO33D09	Calmodulin	H.vulgare	0	99%	M27303	BlastN	(Perruc et al. 2004)
HI09P16	HvCBF6 (CBF2/DREB1-like)	H.vulgare	4.0E-50	99%	AAX23701		(Oh et al. 2007)
HV04I10	HvDhn1 (Dehydrin 1)	H.vulgare	6,0E-23	100%	AAF01689		(Suprunova et al. 2004)
HC02P10	HvDhn6 (Dehydrin 6)	H.vulgare	4.0E-19	97%	AAF01694		(Suprunova et al. 2004)
HO01L05	HvDhn8 (Dehydrin 8)	H.vulgare	2,0E-52	98%	AAD02259		(Choi et al. 1999)
HS08A22	HvDREB1 (DREB2-like)	H.vulgare	2.0E-23	100%	AAY25517		(Sakuma et al. 2006a)
HU05J23	HvDRF1 (DREB2-like)	H.vulgare	3.0E-51	100%	AAO38211		(Xue & Loveridge 2004)
HV09A17	HVA1	H.vulgare	2.0E-48	100%	CAA55041		(Bahieldin et al. 2005)
HG01K10	PRPX	H.vulgare	2.0E-70	99%	CAA34641	Neg. Ctr.	unpublished
HO16L13	HvPKABA1 (SAPK1-like kinase)	H.vulgare	2,0E-112	99%	BAB61736		(Yamauchi et al. 2002)
HS03E24	SnRK1-Type protein kinase	H.vulgare	2.0E-85	83%	CAA07813	Neg. Ctr.	(Radchuk et al. 2006)
HQ01K06	Sodium/proton antiporter HvHNX1	H.vulgare	1.0E-79	100%	BAC56698		(Fukuda et al. 2004)
HO36E09	Thioredoxin CDSP32	O.sativa	2.0E-90	87%	BAC75581		(Broin & Rey 2003)
HR01K17	Tonoplast intrinsic protein	T.aestivum	2,0E-64	95%	ABI96816		(Peng et al. 2007)
HZ41I22	Trehalose-6-phosphate synthase 1	S.lycopersicum	1e-62	90%	ABO61742		(Karim et al. 2007)
HO10E23	Vacuolar pyrophosphatase	H.vulgare	9E-76	90%	BAB18681		(Park et al. 2005)

A kiválasztott géneknek megfelelő EST (Expressed Sequence Tag - expresszált szekvenciasorozat darabja az mRNS végéről) klónokat azonosítottunk és használtunk az RNAi konstrukciók összeállításához (7. ábra).

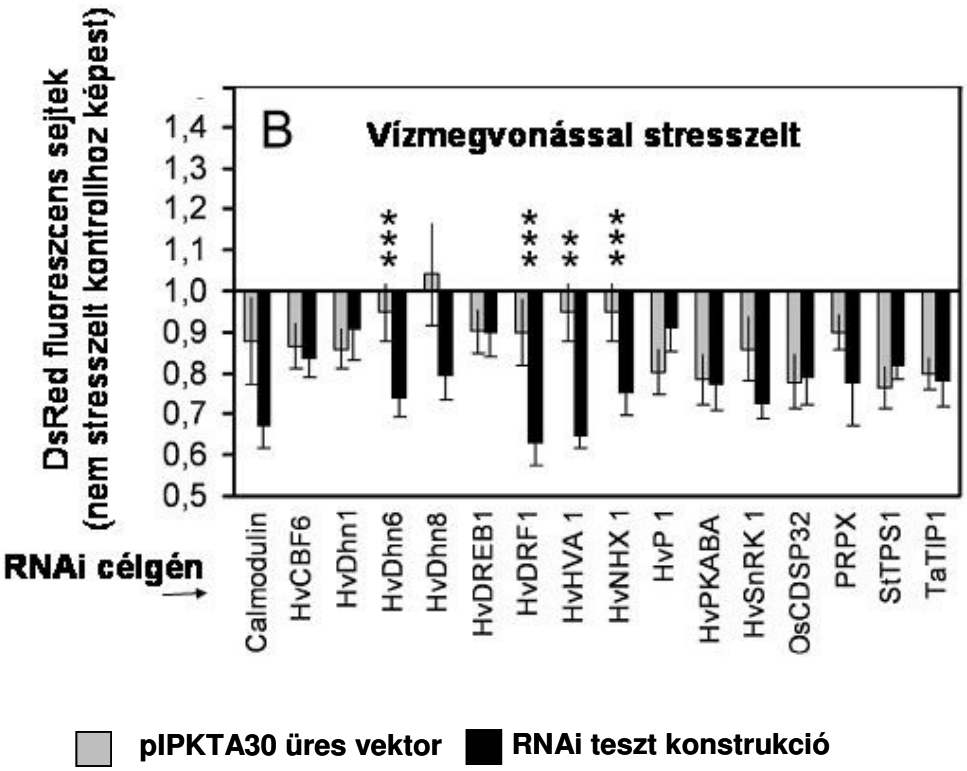


7. ábra. A TIGS rendszerhez használt konstrukciók vázlatos felépítése. Jelmagyarázat: T, terminátor; att R1 és att R2 csatoló helyek az LR klonázhoz; CmR, kloramfenikol rezisztencia gén; ccdB, negatív szelekciós marker; I, RGA2 búza gén intronja (Duchkow és mtsai 2005).

Az RNAi hatásának elemzésére kétfajta összehasonlítást végeztünk. Először összehasonlítottuk a DsRed-fluoreszkáló sejtek számát az RNAi teszt konstrukciók és az üres-vektor kontroll között a nem stresszelt leveleken (8A ábra). A PRPX konstrukció kivételével – kontrollként szerepel, mivel egy pathogenezishez kapcsolódó fehérje - nem találtunk szignifikáns eltérést. Ez jelzi, hogy a szárazság-stresszben részt vevő jelölt gének elcsendesítése általában nem rontja a sejtek vitalitását, nem stresszelt körülmények között. Ezt a statisztikai próbát kevésbé találtuk érzékenynek a kiugró értékekre és ezáltal kevésbé érzékeny a fals negatív eredményekre. Ezért az 1 mintás t-próbát a jelölt gének kezdeti azonosítására használtuk. Ezt követően összehasonlítottuk a DsRed fluoreszkáló sejtek számának stresszindukált visszaesését az üres RNAi és az RNAi tesztkonstrukciók között (8B ábra).



8A. ábra. A jelölt gének csendesítésének (TIGS) hatása a DsRed fluoreszkáló sejtek számára nem stresszelt kontroll levélszegmenseken. A levélszegmenseket egyszerre lőttük be a DsRed és GFP-expressziós plazmiddal plusz egy RNAi konstrukcióval, amit a listán szereplő árpa génekre terveztünk. Ha a jegyzett gén árpában nem ismert, akkor az egyéb fajokban ismert legközelebbi homológjának nevét adtuk meg (lásd még a 10. táblázatban). A vízmegvonás stressz négy napja után számoltuk a DsRed fluoreszkáló sejtek számát és a GFP-hez normalizáltuk. A stresszhatás alatt a kontroll leveleket vizes agaron inkubáltuk. Az oszlopok jelzik a DsRed fluoreszkáló sejtek számát nem kezelt, kontroll leveleken pIPKTA30 üres RNAi vektor ill. az RNAi teszt konstrukció jelenlétében. Öt független kísérlet átlaga ± hibaszórás, kivéve a HvDRF1, HvDhn6, HVA1 és HvNX1, ahol 5 kísérlet két sorozatának összesített adatait mutatjuk*. Statisztikailag szignifikáns differencia ($p<0.05$).



8B. ábra DsRed fluorescens sejtek számának csökkenése dehidratált levél szegmenseken összehasonlítva nem kezelt kontroll levelekkel, üres pIPKTA30 RNAi vektor vagy RNAi teszt konstrukció jelenlétében. Öt független kísérlet átlaga ± hibaszórás, kivéve a HvDRF1, HvDhn6, HVA1 és HvNX1, ahol 5 kísérlet két sorozatának összesített adatait mutatják. A csillagok a statisztikai értékelés szignifikancia szintjeit mutatják: $p<0.01$ és $p<0.001$ megbízhatósági szinten (kétmintás t-próba, kétoldalú).

A dehidratációs stressz az üres RNAi vektor jelenlétében az esetek többségében csökkentette a fluoreszcens DsRed sejtek számát, de ez bizonyos mértékben változott az egyedi kísérletektől (öt) függően, amelyeknek az átlagértéke látható a 8.B ábrán. Az eltérések egyik fő forrása a levelek szélességének különbözősége lehet, amely kis mértékben változott kísérletről kísérletre, és amelyről úgy találtuk, hogy befolyásolja a kiszáradási toleranciát (nem közölt adatok).

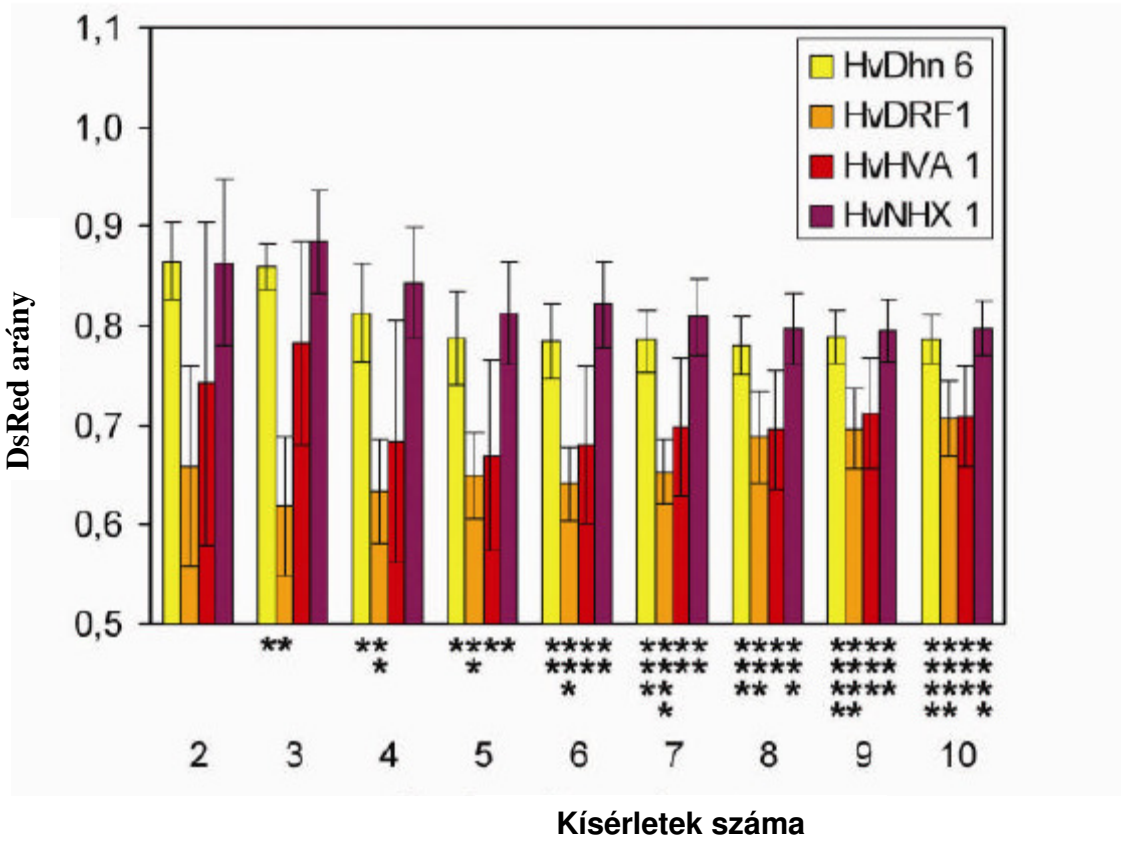
Négy RNAi teszt konstrukció a sejtekben statisztikailag szignifikáns módon tovább csökkentette a DsRed expresszáló sejtek számát a belőtt üres RNAi vektorral való direkt összehasonlításban. Ez a négy RNAi teszt konstrukció a HvDRF1, HvDHn6, HvNX1 és HVA1 génekre volt célozva. Hogy leteszteljük a kezdeti eredmények ismételhetőségét, beállítottunk egy második, öt ismétlésből álló sorozatot, amelyet ugyanazzal a fentebb említett négy RNAi konstrukcióval hajtottunk végre. Mindkét esetben az RNAi konstrukciók a DsRed szignifikáns csökkenését eredményezték a dehidratált levelekben (11. táblázat).

11. táblázat: Négy, jelölt génre tervezett RNAi konstrukció ismételhető, fenotípusos hatása

		DsRed-fluorescens sejtek (kontrollhoz viszonyítva)[a]				
RNAi célgén	Sorozat[b]	pIPKTA30[c]	RNAi-teszt konstr.	*t*-próba[d]	arány[e]	*t*-próba arány[f]
HvDRF1	1	0,813±0,074	0,526±0,057	0,003	0,650±0,043	0,001
HvDRF1	2	0,985±0,137	0,731±0,068	0,053	0,763±0,055	0,012
HvDRF1	mindkettő	0,899±0,079	0,629±0,054	0,0004	0,706±0,038	<0,0001
HvDhn6	1	1,041±0,125	0,808±0,075	0,031	0,787±0,046	0,010
HvDhn6	2	0,856±0,046	0,670±0,024	0,002	0,786±0,021	0,001
HvDhn6	mindkettő	0,949±0,070	0,739±0,044	0,0003	0,786±0,024	<0,0001
HvHVA1	1	1,041±0,125	0,658±0,053	0,065	0,669±0,096	0,026
HvHVA1	2	0,856±0,046	0,636±0,030	0,004	0,747±0,035	0,002
HvHVA1	mindkettő	0,949±0,070	0,647±0,029	0,004	0,708±0,050	<0,0001
HvNHX1	1	1,041±0,125	0,842±0,098	0,041	0,813±0,052	0,023
HvNHX1	2	0,856±0,046	0,666±0,028	0,004	0,782±0,027	0,001
HvNHX1	mindkettő	0,949±0,070	0,754±0,056	0,0003	0,797±0,028	<0,0001

[a]Kontroll, nem stresszelt levélszegmensek.
[b]Minden sorozat öt független kísérletet tartalmaz. Átlagértékek ± középérték hibaszórása
[c]Üres RNAi vektor.
[d]Páros két mintás t-próba, két oldalú.
[e]A normalizált DsRed fluorescens sejtek számának aránya az RNAi tesztkonstrukció és az üres kontroll vektor esetén dehidratált levelekben a belövést követően (4. oszlop/3. oszlop).
[f]Egy mintás t-próba ’1’ hipotézis értékhez, kétoldalú

Tíz független kísérlet adatait használtuk fel, hogy kiszámítsuk a szükséges kísérletek legkisebb számát, ahhoz, hogy statisztikailag szignifikáns eredményhez jussunk a négy RNAi konstrukció TIGS effektusához ($p<0.05$). A 9. ábra mutatja, hogy 3-5 kísérlet volt szükséges a hatások kimutatásához, tíz kísérlet esetén a p értékek általában <0,0001 alá estek. Ezért legalább öt független TIGS kísérlet elvégzését javasoljuk a statisztikailag megbízható adatok érdekében.

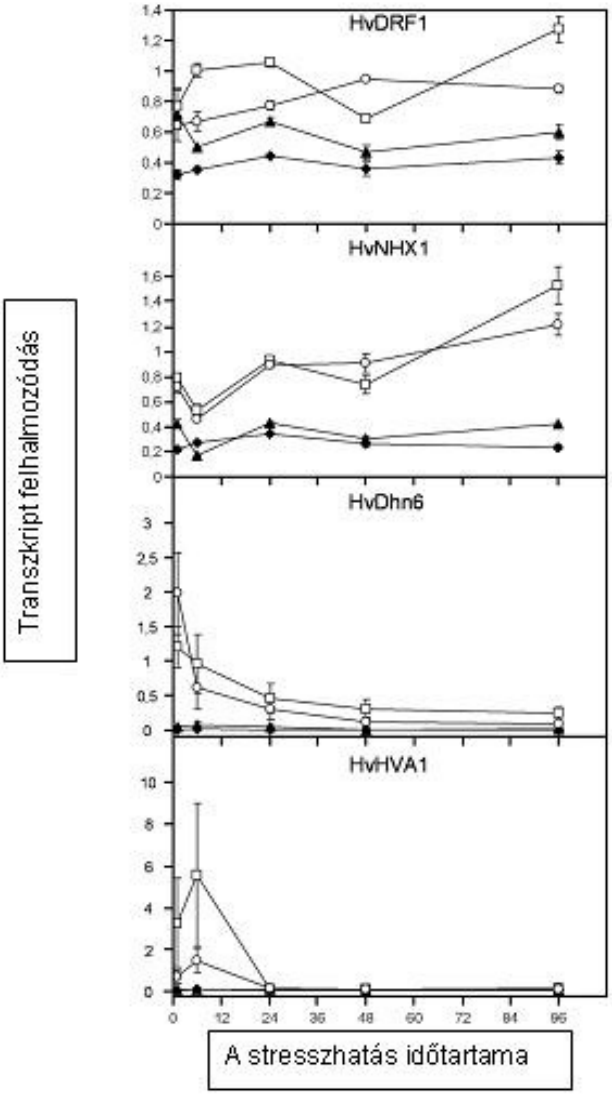


9. ábra. Négy jelölt gén statisztikailag szignifikáns hatásához szükséges, független TIGS kísérletek minimális száma. DsRed – fluorescens sejtek normalizált számának aránya (RNAi teszt konstrukció vs pIPKTA30N üres vektor) dehidratált leveleken. Átlagértékek ± hibaszórás a jelzett számú független kísérletekből. A növekvő számú csillagok minden oszlop alatt jelzik a TIGS hatás növekvő statisztikai szignifikanciáját. Jelmagyarázat: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$; ****, $p<0,0001$

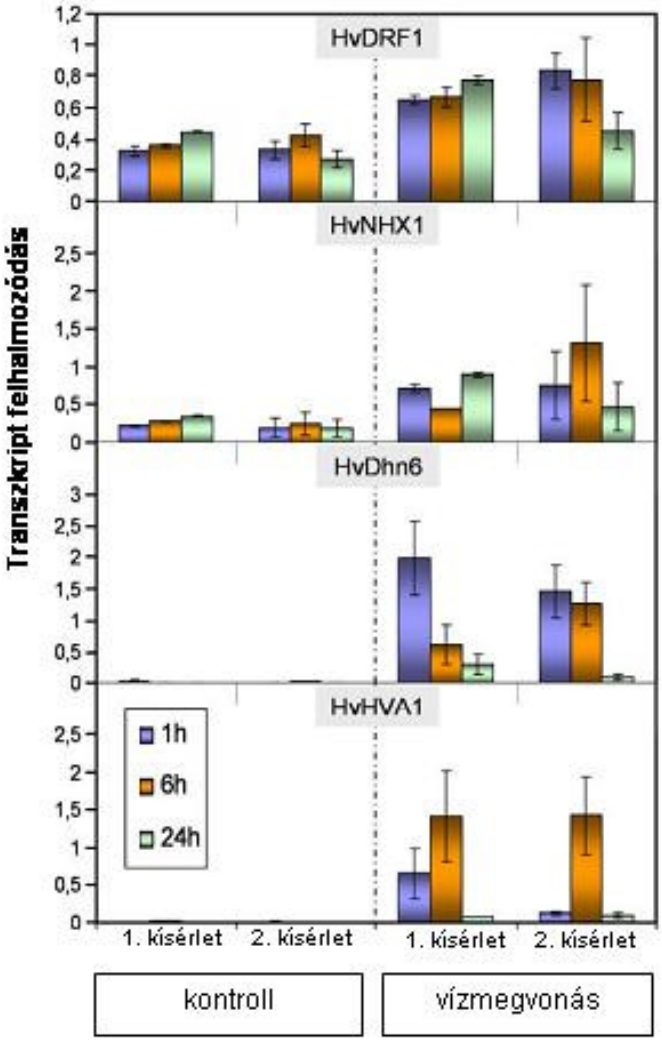
A TIGS rendszer erősségét jelzi a 10 kísérleti sorozat, mely a HvDRF1 génre tervezett RNAi konstrukcióval történt: az első négy és a fennmaradó hat kísérlet során a leveleket az RFW 50 illetőleg 60%-ára dehidratáltuk. Mindkét sorozatban a konstrukció TIGS effektusa jelentős volt (a tesztkonstrukció és a pIPKTA30 üres vektor DsRed aránya stresszelt levelekben a feltételezett érték „1" alatt van ($p< 0,05$). Másrészről a DsRed fluoreszcencia átlagos aránya nem volt szignifikáns a súlyos és a kevésbé súlyos stressz körülmények között ($p=0,12$). Ez azt jelzi, hogy a HvDRF1 RNAi tesztkonstrukció fenotípusos hatását sokféle stressz intenzitás esetén fel tudtuk mérni és ez lehetővé tette a tíz kísérlet adatainak kombinálását (8. ábra). Mindent együttvéve, az itt bemutatott adatok azt mutatták, hogy a TIGS rendszer használható eszköz a gének árpa epidermisz sejtek dehidratációs stresszben betöltött szerepének felderítésében.

4.1.3. Génreguláció

A négy jelölt gén, melyek csökkentették a DsRed fluoreszkáló sejtek számát a dehidratáció-specifikus TIGS rendszerben, fontos szerepet játszhatnak a szárazság toleranciában és ezért különbözően szabályozottak dehidratációs stressz esetén. Annak érdekében, hogy teszteljük a feltevést, kvantitatív reverse-transzkripciós, real-time PCR-t hajtottunk végre a leválasztott levélszegmenseken. Amint a 10. ábra mutatja, mind a négy funkcionálisan validált gén túltermelést mutatott a dehidratációs kezelés alatt, mind a belőtt, mind a nem transzformált levelekben. Mindazonáltal az indukció kinetikája különböző volt a négy gén esetében. A HvDRF1 és HvNHX1 mRNS felhalmozódás a stresszperiódus teljes idejében, míg a HVA1 és HvDhn6 már a dehidratáció kezdete után maximum 6 illetőleg 1 órával elérte a maximumot, és a kísérlet végére, alap szintre tért vissza. A 11. ábrán a négy kiválasztott, jelölt gén normalizált transzkript szintje a dehidratáció alatt és a szabályozás ismételhetősége látható. A 8. táblázatban mutatott adatokkal együtt megerősítettnek látjuk, hogy a belőtt levelek stresszkondíciói eléggé szabványosítottak ahhoz, hogy a TIGS rendszer ismételhető fenotípus adatokat adjon. Végül, bár a transzkript felhalmozódás valószínűleg nem korlátozódott az epidermisz sejtekre, ahol a TIGS fenotípusra gyakorolt hatását vizsgáltuk, a génszabályozás és a TIGS adatok kombinációja konvergens bizonyítékot nyújt és szűrőként használható a dehidratációs stresszben érintett jelölt gének hosszú sorának tesztelésében.



10. ábra. Jelölt gének transzkripciós profilja dehidratált levéldarabokon. A transzkriptek mennyiségi meghatározása reverse transzkripciós real-time PCR-rel a dehidratáció stressz periódus alatt (nyitott jelek) vagy a kontroll inkubáció (kitöltött jelek) (víz-agar) alatt a levelekből izolált RNS-ből. Az RNS izolálás a nem transzformált (▲□) és a belőtt (♦○) levélszegmensekből történt. Az idő mérését a levágott levelek 55 % relatív frisstömegének elérésekor indítottuk. A transzkript felhalmozódást a vizsgált gén és a kontroll NUBC kontroll gén hányadosa alapján határoztuk meg. Átlag érték ± eltérés két független PCR kísérlet adataitól, ugyanazon cDNS mintát használva.



11. ábra. A génreguláció ismételhetősége a leválasztott leveleken végzett dehidratáció stresszelt árpa rendszerben. A levélszegmenseket pGFP és pUbi-DsRed-nos plazmidokkal lőttük be, 24 órával a stresszkezelés előtt. RNS-t tisztítottunk két független dehidratációs kísérletben a jelzett időpontokban. Azonos cDNS minta felhasználásával végzett két független qPCR futtatás átlagértékei, plusz a szórás.

4.2. A búza stabil genetikai transzformáció eredményei

A stabil genetikai transzformáció néhány gazdaságilag fontos növényfaj (kukorica, repce, gyapot stb.) esetében, már gyakorlati célú transzgénikus fajta-előállításban is rutinszerűen alkalmazott. Ez a megállapítás azonban, elsősorban az amerikai földrészre érvényes. Európa legtöbb országában az engedélyezett GM növényfajták gyakorlati célú alkalmazása jelenleg jelentős tássadalmi és gazdasági ellenállásba ütközik. Ezzel szemben a genetikai transzformáció – kutatási célú - funkcionális genomikai alkalmazása, nagy jelentőséggel bír hazánkban is. Nagyteljesítményű transzformációs rendszerek alapvetően fontos szerepet játszanak gének funkciójának meghatározásában. Konkrét, jelölt gének hatását, a gén elhallgattatásával (leszabályozás), vagy túltermeltetésével határozhatjuk meg, de ehhez feltétlen szükség van hatékony transzformációs rendszerre. A dolgozat további része a közvetlen génátviteli eljárás és a vele elérthető eredmények bemutatására törekszik. A laboratóriumunkban a 90-es évek közepén bevezetett és azóta jelentősen továbbfejlesztett részecskebelövésre alapozott módszer eredményeit foglalja össze, három különböző génnel búzában elvégzett – Ph.D. értekezésemhez kötődő - stabil transzformációs kísérlet eredményeinek összegzésével.

4.2.1. Stabil transzformációs kísérletek, plazmidok együttes bejuttatásával

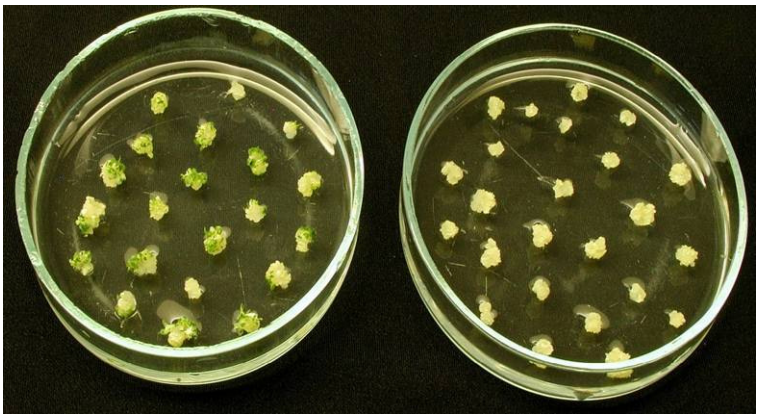
Az Mlo géncsendesítésre irányuló transzformációs kísérleteinket a markergént (pAHC20) és a célkonstrukciót (pStarling) külön-külön plazmidban tartalmazó, egy-egy mennyiségi részarányban kevert, együttes transzformációval végeztük, az alábbi részeredményekkel.

Növényi oldalról, a ’CY-45’ tavaszi búza genotípus éretlen embrióit használtuk inokulumként. Korábbi transzformációs tapasztalataink szerint, laboratóriumunkban ez a legjobb búza genotípus a részecskebelövésen alapuló transzformációhoz. A ’CY-45’ genotípusnak kiváló *in vitro* növényregenerációs képessége, amely a hatékony génbeviteli rendszer egyik fontos módszertani alapja. Genetikai transzformációk esetén fontosak a recipiens genotípus un. vadtípusú tulajdonságai. A ’CY-45’ genotípus ismereteink alapján lisztharmatra érzékeny. Ebben a kísérletben a lisztharmat-fogékonyság kifejezetten előnyösnek látszik, a bejuttatott fordítottan ismétlődő szekvenciák hatásának végső ellenőrzésekor.

Kísérletünk során összesen 3650 éretlen embriót izoláltunk. Az izolált embrióinkat dediferrenciáltuk D_2-es táptalajon, a kalluszosodás az embriók izolálása után 5-10 nappal megindult. Így kaptuk a belövéshez a részben már dediferrenciált kalluszokat. Petri-csészénként 25 embriót raktunk le, és lőttünk be a két plazmid molekulával (1. és 2. ábra, pStarling-A, pAHC20). A plazmid oldatokat a következő mennyiségben, egy-egy arányban adagoltuk az egyes

transzformációs kísérletekben: 3-3 µl, 5-5 µl vagy 4-4 µl (Anyag és módszer: 4. táblázat,).

Kísérletenként 50 db éretlen embriót, belövés nélküli kontrollként kezeltünk. Ezeket a nem transzformált embriókat a transzformációs lépés kivételével ugyanúgy kezeltük, mint a transzformáltakat. A nem transzformált kalluszok a szelekciós molekula (PPT) hatására elhalványultak, fejlődést nem mutattak, majd elpusztultak (12. ábra). A transzformációs kísérletben szereplő kalluszok egy része, amelyek genomjába nem integrálódott a transzgén, szintén elpusztultak. Ezzel szemben azok a kalluszok, melyekbe sikeresen bejutott és feltehetően expresszálódott a markergén, ott a regeneráció jelei mutatkoztak. A szelekciós idő előrehaladtával egyre jobban megerősödő hajtáskezdemények fejlődtek.



12. ábra. A bal oldali Petri-csészében levő embriókon a regeneráció jelei mutatkoznak, zöldülni kezdtek. A jobb oldali Petri-csészében látható a belövés nélküli kontroll embriók, melyek nem zöldülnek, nem indultak fejlődésnek és később elhaltak.

A regenerálást tovább folytatva 707 darab növénykét áthelyeztünk egyedi növénynevelő csövekbe, ahol foszfinotricin tartalmú hormonmentes táptalajt alkalmaztunk 20 mg/l ppt-t alkalmazva a szelekcióra (13. ábra). Ezzel sikeresen kialakítottuk - éretlen embriókból kiindulva - a ppt szelekción alapuló transzgénikus növényi modellt, amely kísérletünk alappillére volt.

A 13. táblázatból jól látható, hogy az embriók regenerálódásukat tekintve a 4-4 µl 150 µl etanolban felszuszpendált aranyrészecske bizonyult a leghatékonyabbnak, itt a belőtt embriók 37,42 %-a került egyedi növénynevelő csövekbe (2 cm felett). Legkevésbé sikeres regenerálást indítottunk az 5-5 µl 84 µl etanolban felszuszpendált kísérletünk során, itt mindössze az embriók 23,35 %-át tudtuk átrakni a növénynevelő csövekbe.

13. ábra. A szelektív körülmények között indított növényregenerálás eredménye. A regeneránsok egy része, egyedenként elkülönítve, önálló tenyésztőcsőben.

Növényeink megfelelően megerősödtek, majd meggyökeresedtek a szelektív körülmények között. Ezt követően kiültettük őket közönséges üvegházi neveléshez használatos talajba, alulról nyitott PVC csövekbe (PVC = polivinilklorid), zárt rendszerű üvegházi körülmények közé. Növényeinket védtük az erős párolgástól, ezért polietilén, izoláló zacskóval takartuk őket, majd igény szerint ezeket eltávolítottuk. Sikeresen regenerált növényeink száma 106, mely százalékos hatékonyságban - a kiinduláskori 3650 db embrióra vetítve- 2,9 %. Plazmid molekula arányokra nézve a leghatékonyabb növényi kiültetést az 5-5 µl 84µl etanolban felszuszpendált aranyrészecskék bizonyultak, 5,51 %-al. Míg a legkevesebb növényi kiültetést a 3-3 µl 84 µl etanollal végzett kísérletünkből kaptuk (10. táblázat). A kiültetést túlélő növényeink száma 66 (1,8 %), elpusztult növényeink száma 40 (1,09 %) volt.

Egy hét elteltével a kiültetést túlélő, zölden maradt növények DNS szintű tesztelését végeztük el. Kísérleteink célja a transzgénikus jelölt növények közül a ténylegesen (a bejuttatott DNS szekvenciákat tartalmazó) transzgénikus egyedek azonosítása. Molekuláris módszerekkel meg kellett állapítanunk, hogy a jelöltek valóban tartalmazzák-e a beépített géneket, és ezek kifejeződésre jutnak-e a vizsgált növényekben. A megfelelően fejlődő, megerősödött

növényeinket két hét eltelte után 1%-os Finale 14 SL gyomirtószerrel permeteztük le.

Permetezés után életben maradt és elhalt növényi minták láthatók a 14. ábrán.

14. ábra. Az elhalt (a föld felszínén látható drapp színű növény maradványok, nyíllal jelölve) és életben maradt transzgénikus jelölt növények zárt üvegházi nevelés alatt PPT permetezés után 14 nappal.

4.2.1.1. Transzgénikus jelölt növények molekuláris jellemzése

Transzgénikus jelölt növényeinket molekuláris szinten vizsgáltuk, illetve jellemeztük. Célunk az volt, hogy DNS szinten is bizonyítsuk, valóban transzgénikus növényekről van szó. A transzgénikus jelölt növényekből és kontroll növényekből (melyek transzformáció nélkül voltak regenerálva) levélmintát vettünk, majd genomi DNS-t izoláltunk, melyeket PCR technikával tovább vizsgáltunk (66 db növényi minta), a többi 40 növény elpusztult a kiültetés után. A kapott DNS mintákkal PCR vizsgálatot végeztünk a *bar*,

szensz és *antiszensz* szekvenciára nézve. A növényi minták PCR analízisét elvégeztük.

PCR vizsgálat során megállapítottuk, hogy hány tartalmazza a *bar*, a *szensz* és az *antiszensz* Mlo1 szekvenciát a transzgénikus jelölt növényeink közül. A kapott PCR termékeket gélelektroforézis technika segítségével megvizsgáltuk (15. ábra; 16. ábra; 17. ábra). Kapott eredményeinket a 12. számú táblázat mutatja, melyben megtalálhatók azok a növények, melyek túlélték a kiültetést, belőlük levélmintát vettünk, majd DNS-t izoláltunk. A táblázat mutatja a vizsgált növényegyedek egyedi jelölését, a belövés során az együtt transzformált plazmid konstrukciók mennyiségét, valamint a vizsgált szekvenciákra specifikus PCR reakciók eredményét. A táblázatból szembetűnően látszik, hogy a szelekciós marker gén ugyanazon növényegyedekben van jelen, amelyekben az Mlo génre célzott szensz és antiszensz szekvenciák is jelen vannak. Azoknál a növényeknél, ahol 84µl helyett 150 µl etanolos hígítást használtunk, ezt külön feltüntettük (a táblázat 4. oszlopa). A PCR teszt elvégzése után elvégeztük a jelölt növényeink herbicides permetezését, mely szintén teljes mértékben egybeesett a molekuláris teszt eredményével, a bar génre pozitív 25 növényünk mindegyike túlélt, a nem transzgénikus növények mindegyike elpusztult. Az együtt transzformáció DNS szintű vizsgálati eredményeit a 13. táblázat utolsó három oszlopában foglaltuk össze.

12. táblázat. Kiültetett növények transzformációja és a molekuláris teszt eredménye. Az első oszlopban a DNS minta jelölését, a második oszlopban a növények egyedi jelölése látható (Petri-csésze száma/*in vitro* növényegyed sorszáma). A harmadik és negyedik oszlop jelzi az együtt transzformált plazmidokat és azok mennyiségét. A 150 µl etanolos hígítással transzformált növények esetén a hígítást külön jelöltük. Az 5-7. oszlopban a PCR reakciók eredményei láthatók.

minta száma	Jele	Plazmid	Plazmidok aránya (µl- µl)	Bar +	Mlo szensz +	Mlo antiszensz +
1.	64/2	pStarling-A, pAHC20	5-5	pozitív	pozitív	pozitív
2.	73/7	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
3.	64/3	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
4.	54/4	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
5.	41/4	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
6.	69/7	pStarling-A, pAHC20	5-5	pozitív	pozitív	pozitív
7.	51/5	pStarling-A, pAHC20	5-5	pozitív	pozitív	pozitív
8.	59/9	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
9.	72/3	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
10.	51/3	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
11.	73/8	pStarling-A, pAHC20	5-5	pozitív	pozitív	pozitív
12.	46/7	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
13.	40/7	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
14.	69/9	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
15.	69/6	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
16.	59/10	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
17.	83/2	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	nagyobb fragment
18.	82/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	-	-	-
19.	114/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	-	-	-
20.	26/5	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-
21.	26/5-2	pStarling-A, pAHC20	3-3	pozitív	pozitív	pozitív
22.	27/4	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-
23.	17/2	pStarling-A, pAHC20	3-3	pozitív	pozitív	pozitív
24.	5/3	pStarling-A, pAHC20	3-3	pozitív	pozitív	pozitív
25.	86/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
26.	80/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	-	-	-
27.	94/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	dupla sáv	pozitív
28.	97/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
29.	76/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
30.	63/1	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-

31.	73/15	pStarling-A, pAHC20	5-5	pozitív	pozitív	pozitív
32.	14/2	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-
33.	65/3	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
34.	117/5	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
35.	105/5	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
36.	116/4	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	pozitív	pozitív	pozitív
37.	129/15	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
38.	40/14	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
39.	9/2	pStarling-A, pAHC20	3-3	pozitív	pozitív	pozitív
40.	20/5	pStarling-A, pAHC20	3-3	pozitív	pozitív	pozitív
41.	4/1	pStarling-A, pAHC20	3-3	pozitív	pozitív	pozitív
42.	136/2	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
43.	128/3	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
44.	127/2	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
45.	94/3	pStarling-A, pAHC20	4-4	-	-	-
46.	92/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	-	-	-
47.	126/1	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
48.	50/8	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
49.	26/6	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-
50.	76/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	-	-	-
51.	121/6	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
52.	89/3	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
53.	71/7	pStarling-A, pAHC20	5-5	-	-	-
54.	62/1	pStarling-A, pAHC20	5-5	pozitív	pozitív	pozitív
55.	124/3	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	pozitív	pozitív	pozitív
56.	7/7	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-
57.	82/2	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
58.	78/1	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
59.	88/4	pStarling-A, pAHC20	4-4	pozitív	pozitív	pozitív
60.	127/1	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
61.	119/3	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
62.	141/2	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
63.	117/2	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	-	-	-
64.	26/1	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-
65.	120/2	pStarling-A, pAHC20	4-4 150µl eth	pozitív	pozitív	pozitív
66.	29/1	pStarling-A, pAHC20	3-3	-	-	-

A 66 növényből 25 esetben kaptunk *bar* génre nézve pozitív eredményt, a *szensz* és *antiszen*sz orientációjú inszertekre nézve szintén 25 minta bizonyult pozitívnak. Kiindulási anyagunk 3650 embrió volt, ez Petri-csészénként 25 db éretlen embriót jelentett. A belövést 775 embriónál 150 µl etanol hozzáadásával végeztük, melyhez 4-4 µl pSTARLING-A, pAHC20 plazmid molekulát adtunk. Ebből a sorozatból mindössze 2 (0,25 %) minta bizonyult a

bar, szensz és antiszensz génre nézve pozitívnak. 950 embriónál a belövést 84 µl etanol hozzáadásával végeztük, melyhez 3-3 µl pSTARLING-A, pAHC20 plazmid molekulát adtunk, melyből összesen 6 (0,63 %) minta lett pozitív a vizsgált génekre nézve. 925 embriót, 5-5 µl plazmid molekulát adtunk, 84 µl etanol hozzáadása mellett. Ilyen feltételek mellett 6 (0,64 %) minta bizonyult pozitívnak a vizsgált génekre nézve. Végül 1000 embrió belövését végeztük el 4-4 µl plazmid hozzáadásával, 84 µl etanol hozzáadásával. Pozitív mintáink száma 11 db (1,1 %) volt, a bejuttatni kívánt génekre nézve.

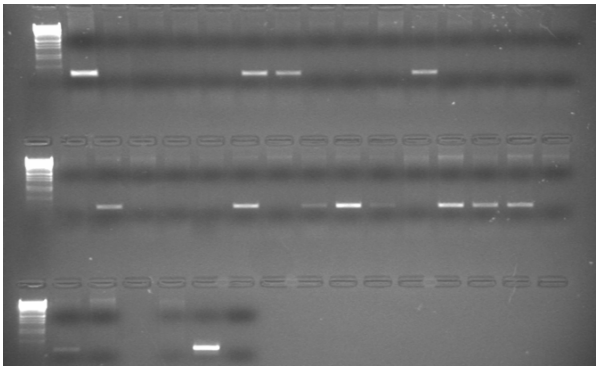
13. táblázat. Plazmidok együttes transzformálásával végzett kísérletek összefoglaló eredményei. A négy transzformációs sorozat során alkalmazott plazmid mennyiségeket és a hígításhoz használt etanol mennyiségét tüntettük fel a második oszlopban. A 3. és 4. oszlop mutatja a növényregeneráció eredményeit, a növények darabszámát és a százalékos arányt a transzformált embriókhoz viszonyítva. Az 5-7. oszlop adatai mutatják a DNS szintű molekuláris tesztek (PCR) eredményeit, ahol szintén a bevitt szekvenciát hordozó növények egyedszámát és százalékos értékét tüntettük fel.

Belőtt embriók (db)	**Plazmid arány, etanol**	**Növények csőben (db)**		**Kiültetett növények**		**Bar +**		**szensz+**		**antiszensz+**	
		(db)	*%*	**(db)**	*%*	**(db)**	*%*	**(db)**	*%*	**(db)**	*%*
950	3-3 84 µl	103	*10,84*	14	*1,47*	6	*0,63*	6	*0,63*	6	*0,63*
925	5-5 84 µl	216	*23,35*	51	*5,51*	6	*0,64*	6	*0,64*	6	*0,64*
1000	4-4 84 µl	98	*9,8*	21	*2,1*	11	**1,1**	**11**	**1,1**	**11**	**1,1**
775	4-4 150 µl	290	*37,42*	20	*2,58*	2	**0,25**	**2**	**0,25**	**2**	**0,25**
3650		**707**	**19,37**	**106**	**2,90**	**25**	**0,68**	**25**	**0,68**	**25**	**0,68**

A belövéshez alkalmazott etanol mennyiségek alapján megállapítottuk, hogy a 84 µl etanolban felszuszpendált aranyszemcsével végzett belövés jóval hatékonyabb, mint a 150 µl etanolban felszuszpendált aranyszemcsével végzett belövés, ahol a belőtt minták közül mindössze 0,25 %-uk mutatott pozitív jelleget, ahogyan azt a 13. táblázat is mutatja.

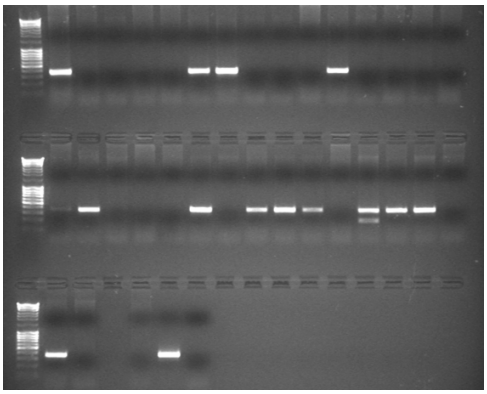
Összességében elmondható, hogy a 4-4 µl 84 µl etanolban felszuszpendált aranyszemcsével végzett kísérletünk volt a leghatékonyabb, 1,1 %-ban (11 növénynél) értünk el pozitív eredményt az 100 belőtt embrióra számítva (13. táblázat).

A specifikus PCR reakciók gélképei (1-32. vizsgált mintával szemléltetjük) egyértelmű bizonyítékkal szolgáltak a bejuttatott szekvenciák jelenlétéről, melyeket később a herbicides permetezés eredménye is megerősített.



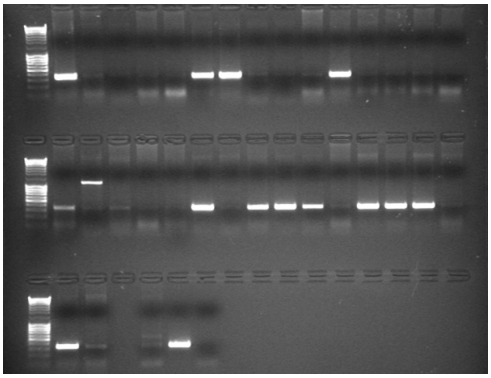
15. ábra MLO1 *Bar* PCR, 1-32. minta:
1. sor: marker; 1-15. minta,
2. sor: marker; 16-30. minta,
3. sor: marker; 31-32. minta; üres zseb; blank; plazmid; negatív növényi kontroll

A gélképen jól látható, hogy a *bar* gén esetében 13 minta mutatott pozitív eredményt. Ugyanezen növénymintákkal (1-32. minta) elvégeztük a PCR reakciót a szensz és antiszensz Mlo szekvenciára tervezett primerpárral is (16. ábra és 17. ábra).



16. ábra MLO1 *Szensz* PCR, 1-32. minta:

1. sor: marker; 1-15. minta,
2. sor: marker; 16-30. minta,
3. sor: marker; 31-32. minta; üres zseb; blank; plazmid; negatív növényi kontroll.



17. ábra Mlo1 *Antiszensz* PCR, 1-32. minta:
1. sor: marker; 1-15. minta,
2. sor: marker; 16-30. minta,
3. sor: marker; 31-32. minta; üres zseb; blank; plazmid; negatív növényi kontroll.

A szensz és antiszensz Mlo PCR gélképén jól látható, hogy a 32 izolált DNS mintából 13 pozitív eredményt mutatott. *Mlo1* szensz gélképén, a vizsgált minták közül a 27. dupla sávot mutat, *Mlo1* antiszensz gélképén, a 17. minta esetén a vártnál nagyobb méretű fragmentet kaptunk. Ezek a minták *bar* génre vizsgálva viszont pozitív jelleget mutattak, a későbbiekben tervezett RNS szintű vizsgálatokkal fogjuk majd tisztázni, van-e detektálható génexpresszió a transzformált növényeinkben. A PCR reakciót természetesen elvégeztük a 33-66. mintákkal is a vizsgált génekre nézve (12. táblázat) is, de gélképeit itt most nem mutattuk be.

4.2.2. Stabil genetikai transzformáció MsALR gént tartalmazó transzformánsok létrehozására és a transzformánsok DNS szintű vizsgálata

Az *MsALR* génnel transzformált búza vonalaink létrehozása a közvetlen génbeviteli módszer alkalmazásának egyik tipikus példája. Ebben az esetben a cél (MsALR) és marker gént egy vektor molekulába beépítve együtt transzformáltuk búzába. Az anyag és módszer fejezetben leírt transzformációs eljárást hajtottuk végre és a kísérlet eredményei az alábbiakban találhatók.

A transzformációt megalapozó előtenyésztés az itt bemutatott öt kísérletben is 7 és 9 nap között változott, ami lényegében azonos fejlettségi állapotot jelentett a belőtt embriók esetében. Az öt kísérletben összesen 4025 db éretlen embrió eredetű kalluszt transzformáltunk. A transzformált embriók mennyiségét alapvetően meghatározta az aktuálisan rendelkezésre álló, megfelelő fejlettségi állapotú éretlen szemek mennysége, továbbá az egy fő által egyszerre kezelhető növényi alapanyag.

Az első három transzformációs kísérletben ideális állapotú, üvegházi körülmények között nevelt növényi alapanyagot használtunk. Növényeink természetesen nem érték el a tenyészkerti körülmények között tapasztalható méretet, de az éretlen embriók fejlettsége egységes volt, míg a negyedik és ötödik transzformációs sorozatban tenyészkerti növényanyagot használtunk. Az üvegházban felnevelt növényeink magasságban, bokrosodásban, fejlettségben jelentősen elmaradtak a tenyészkertben szedett donor kalászoktól, mégis az embriók fejlettsége a kalászokon belül sokkal kiegyenlítettebb volt. A tenyészkerti növényanyag éretlen embriói azonos fenofázist tekintve méretben is megelőzték az üvegház eredetű növényeket.

Az embrióizolálást követő előtenyésztési szakasz 2 mg/l 2,4-D tartalmú szilárd táptalajon a búza embriók sejtjeinek gyors osztódását eredményezte. A búza differenciálódott szövetei – a külsőleg adott auxin hatására - rövid idő alatt a dedifferenciálódás irányába osztódtak tovább. Megindult a kalluszképződés, de a 7-9 napos előtenyésztés után szabad szemmel még érzékelhető volt az embriók differenciálódott struktúrája. A belövést megelőző ozmotikus kezelés

szemmel alig látható változással járt, korábbi tapasztalatok szerint előnyös hatással bír a transzgénikus jelöltek regeneráló-képességére. A belövés körülményei, az anyag és módszerben található protokoll szerint folytak.

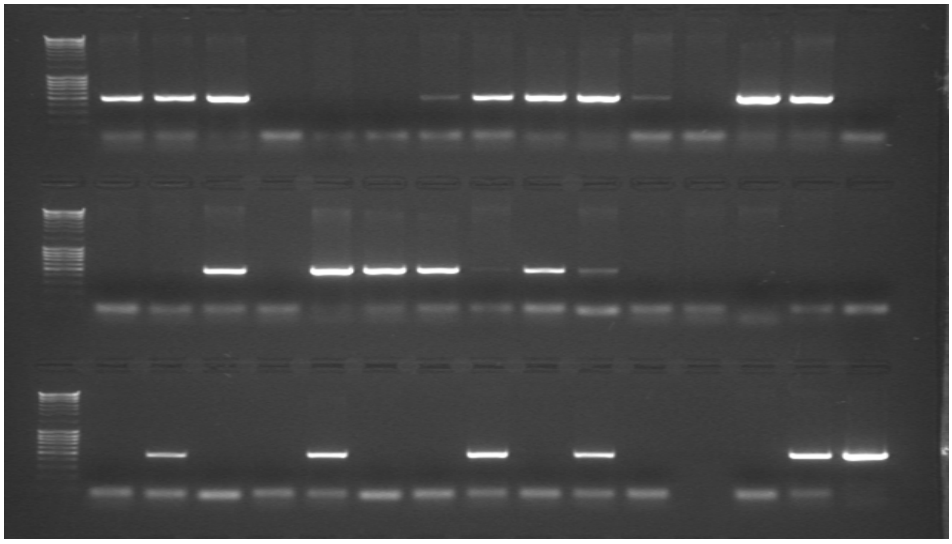
A *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz génnel végzett transzformációs kísérlet eredményeinek összefoglalását a 14. táblázat összegzi.

14. táblázat. Az *MsAlr* génnel végzett transzformációs kísérletek eredményei. Az 1-3. kísérletben üvegházi, a 4-5. sorozatban tenyészkerti növényanyagot használtunk.

Transzformációs kísérlet jelölése	Belőtt embrió	*In vitro* növénykék		Talajba kiültetett növények		bar+ növények		ALR+ Bar+	Hatékonyság, transzgénikus növény/100 embrió
	(db)	(db)	%	(db)	%	(db)	%	(db)	%
1.	975	95	9,74	26	2,67	10	1,03	8	0,82
2.	1050	234	22,29	15	1,43	3	0,29	3	0,29
3.	800	115	14,38	12	1,5	5	0,625	5	0,625
4.	575	89	15,48	3	0,52	2	0,35	2	0,35
5.	625	152	24,32	3	0,48	1	0,16	1	0,16
Összesen	**4025**	**685**	**17,02**	**59**	**1,47**	**21**	**0,52**	**19**	**0,47**

A 14. táblázat adataiból jól látható, hogy a kéthetes kalluszindukciós fázis és az azt követő több mint négyhetes regenerációs, szelekciós szakasz minden esetben nagyszámú transzgénikus jelölt növényt eredményezett. A növényregeneráció e fázisában minden esetben a jelölt növénykék nagyfokú mozaikosságával kell számolni (kimérák). A 685 db *in vitro*, 2 cm nagyságot elért növény közül mindössze 19 növény lett molekuláris tesztekkel is bizonyítottan transzgénikus. Mind az öt kísérlet során kísérletenként 50 db embriót nem transzformált kontrollként használtunk, melyeket a kísérletben részt vevő embriók transzformációját követően azokkal azonosan kezeltünk. Ezekben a tenyészetekben egyáltalán nem tapasztaltunk növényregenerálódást. Minden transzformáció nélküli kalluszunk az első szelektív táptalajon kifehéredett, elhalványult és elpusztult. Ezzel szemben minden transzformált tenyészet kalluszai zöldülni kezdtek. A zöldülés soha sem az egész kalluszt

érintő folyamat volt. Egyes pontokból kiindulva, a találatot kapott sejtek, sejtcsoportok zöldülése volt megfigyelhető. A zöld részek ezt követően egyre erőteljesebb növénykezdeményekké alakultak. Habár a szelekció első fázisában még minden tenyészet nagyszámban tartalmazott zöldülő kalluszt, a szelekciós folyamat előrehaladtával számuk minden esetben lépésről lépésre jelentősen csökkent. A regeneráció utolsó szakaszát elérő, kb. 2 cm-t meghaladó, hajtást és gyökeret növesztő növények 9,74 - 24,32 %-ban voltak előállíthatók a különböző kísérletekben. Az egyedi növénynevelő csövekben tovább szelektált növények- az erős szelekció hatására- vagy elpusztultak, illetve megállt a növekedésük, vagy belőlük egészséges gyökérzetet fejlesztő, üvegházi körülmények közé kiültethető transzgénikus jelölt növénykéket kaptunk. Ezek százalékos aránya erőteljesen lecsökkent, mindössze 0,48 - 2,67 % között volt. Ez az eredmény a bejuttatott konstrukció nagyfokú kezdeti instabilitására illetve erős mozaikosságra utalt. Az üvegházi körülmények közé, talajba kiültetett, meggyökeresedett növénykéinkből ezt követően genomi DNS mintát tisztítottunk, majd specifikus primerek felhasználásával ellenőriztük a transzgének jelenlétét. Vizsgálatokat végeztünk mind a szelekciós markergénre, mind az *MsALR* génre nézve. Az öt transzformációs sorozatból összesen 21 transzgénikus növényt kaptunk, ezek közül kettő esetben csak a szelekciós markergén volt kimutatható, 19 növénynél mindkét gén jelenlétét igazolni tudtuk. A specifikus primerekkel végzett PCR reakció eredményét a 18. ábra mutatja.



18. ábra. Az első 41 transzgénikus jelölt növény PCR reakciójának képe az MsALR génre specifikus primerekkel. Minden sor első oszlopában molekulatömeg marker található. Az utolsó három minta: - kontroll növényi minta; pozitív kontroll növény; pAHALR plazmid kontroll.

A *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz génnel végzett transzformációs kísérleteinkben sikerrel vittük át búzába mind a célgént, mind a szelekciós markergént. A PCR reakcióval végzett tesztelés után két olyan növényt találtunk, melyben a markergén jelenlétét igazoltuk, de az aldóz-reduktáz gén jelenléte nem volt bizonyítható. A *bar* szelekcióra épülő transzformációs rendszer sajátosságából adódóan fordított helyzet nem fordult elő. Minden aldóz-reduktáz gént hordozó növényben kimutatható volt a *bar* gén jelenléte. A kísérleteket összegezve megállapítottuk a száz belőtt embrióra jutó transzgénikus növények arányát. A különböző kísérletekben a transzformáció hatékonysága 0,16 - 1,03 %-os volt a *bar* génre nézve. A célgént tekintve 0,16 - 0,82 %-os hatékonyságot sikerült elérni.

4.2.3. NBS-LRR levélrozsda rezisztenciában jelölt gének stabil transzformációja

A búza levélrozsda-rezisztencia kialakítására végzett transzformációs kísérleteinkben a leggyakrabban alkalmazott CY-45 búza genotípus mellett, kísérletbe vontuk a GK Tavasz tavaszi búzafajtát is. Tavaszi fajta lévén- a

vernalizációs igény nélkül- alkalmas alanynak tűnt az NBS-LRR típusú génanalógokkal végzett kísérletekben. A dolgozatban hét, különböző NBS-LRR rezisztenciagén-analógokkal végzett transzformációs sorozat eredményeit mutatjuk be.

A biotikus ellenállóság fokozását tekintve transzformációs módszerrel mindeddig kevés adat állt rendelkezésünkre. Más fajokban (rizs, árpa, kukorica) igen biztató eredmények láttak napvilágot, melyek transzformációja búzában nagy jelentőségű lehet nemesítési szempontból és hozzájárul az adott gén funkciójának részletes megértéséhez.

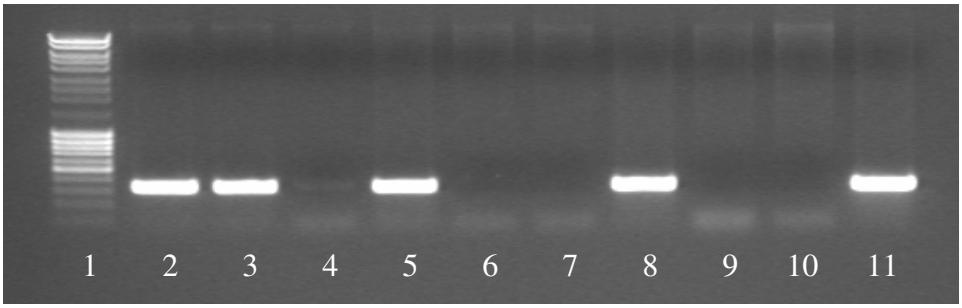
Az NBS-LRR génanalógok izolálását a kiváló rezisztencia tulajdonságokkal rendelkező *Triticum monococcum* „Albini" vonalon kezdte el három évvel ezelőtt fontos kooperációs partnerünk Dallmann Géza, aki megszekvenált számos domén-homológia alapján izolált rezisztenciagén analóg /RGA/ DNS fragmentet. A növényi stabil transzformálásra alkalmas klónokkal a búza transzformációt a GK KhT-ban végeztük el. A transzformációs eredményeink számszerű adatait a 15. táblázat foglalja össze.

E transzformációk során a jól bevált *bar* herbicidrezisztenca-gént használtuk szelekciós markerként. Sikeres transzformációt hajtottunk végre három különböző *T. monococcum* eredetű NBS-LRR rezisztenciagén analóggal (361, 362, 363). Sikeresen jutattuk be ezek antiszensz formában vektorba épített változatát (371, 373) a GK Tavasz tavaszi fajtába, valamint két különböző, rizs (*Oryza sativa*) eredetű NBS-LRR génanalógot juttatunk be a CY-45 genotípusba. Az összesen 3150 éretlen búza embrió transzformációja során 34 független transzformáns vonalat állítottunk elő, ami 100 transzformált embrióra vetítve 1,08 %-os átlagos hatékonyságnak felelt meg. A *Triticum monococcum* eredetű rezisztencia analóg gének szensz orientációjú bevitele 1,21 %, 0,83 %, és 1,78 %-os hatékonyságú volt. A GK Tavasz *in vitro* regeneráló képessége jelentősen gyengébb a CY-45 genotípusnál. Ez a kalluszindukciós lépés során megmutatkozó gyengébb minőség jelentkezett a kísérletek során is. Az antiszensz orientációban bevitt génekkel történő transzformáció itt 0,89 % és 0,44 %-os hatékonyságú volt. Az *Oryza* eredetű rezisztenciagének bejuttatásának hatékonysága 1,47 és 0,62 %-os volt, 7 és 2 db transzgénikus növényt regeneráltunk. Figyelemre méltó, hogy a regenerált, egyedi növénynevelő csövekbe helyezett transzgénikus jelölt növények aránya az összes kísérlet átlagában eléri a 31,52 %-ot, míg a GK Tavasz esetében ez mindkét kísérletben 10 % alatt maradt (8 és 9,78 %).

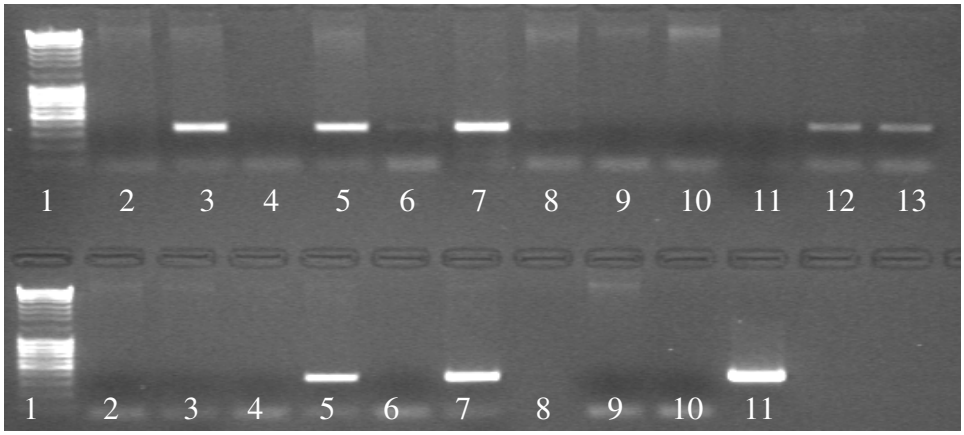
15. **táblázat** NBS-LRR típusú génanalógokkal végzett transzformációs kísérletek eredményének összefoglaló adatai.

Kísérlet sorszáma	NBS-LRR klón	Felhasz-nált genotípus	Belőtt embriók száma	Növények üvegcsőben		Talajba kiültetett növények		bar+ növények		NBS-LRR+, Bar+	Hatékonyság, transzgénikus növény/100 embrió
			(db)	(db)	%	(db)	%	(db)	%	(db)	%
1.	361 (*T. monococcum*)	CY-45	825	322	39,03	53	6,42	10	1,21	10	1,21
2.	362 (*T. monococcum*)	CY-45	725	257	35,45	39	5,38	6	0,83	6	0,83
3.	363 (*T. monococcum*)	CY-45	350	166	47,43	21	6	6	1,71	6	1,71
4.	371 (*T. monococcum*) antiszensz	GK tavasz	225	22	9,78	6	2,67	2	0,89	2	0,89
5.	373(*T. monococcum*) antiszensz	GK tavasz	225	18	8	4	1,78	1	0,44	1	0,44
6.	15.2 (*Oryza sativa*)	CY-45	475	109	22,95	16	3,37	7	1,47	7	1,47
7.	25.4 (*Oryza sativa*)	CY-45	325	99	30,46	7	2,15	2	0,62	2	0,62
Összesen			**3150**	**993**	**31,52**	**146**	**4,63**	**34**	**1,08**	**34**	**1,08**

A sikeresnek bizonyuló növényregenerációt követően növényeinket üvegházi körülmények közé ültettük ki. Kéthetes akklimatizáció után a megerősödött növényekből DNS mintát tisztítottunk a *bar* génre és az adott NBS-LRR rezisztenciagénre specifikus PCR reakciókhoz, majd herbicides permetezéssel szelektáltuk az esetleges megmenekült növényeket. A PCR reakciók eredménye bizonyította a transzformáció tényét. A markergén és a rezisztenciagének jelenléte minden transzformációs esemény esetében egybeesett. Nem találtunk olyan növényt, melyben a markergén jelenléte mellett nem lett volna kimutatható a rezisztenciagén. A 19. ábrán a 361-es rezisztencia analóg génnel transzformált növények specifikus primerekkel végzett PCR reakciójának gélképe látható, a 20. képen a 15.2 rezisztenciagén analóg transzformáns növények mintáinak gélképe.



19. ábra. *Triticum monococcum* eredetű, 361-es NBS-LRR génanalóggal transzformált növények specifikus PCR reakciójának gélképe. Az első oszlopban molekulatömeg marker található. 2-8. oszlop: pozitív (2, 3, 5, 8) és negatív (4, 6, 7) transzgénikus jelölt növénykék mintái. Az utolsó három minta: - kontroll negatív növényi minta (9); blank (10); plazmid kontroll 11).



20. ábra. *Oryza sativa* eredetű, 15.2-es NBS-LRR génanalóggal transzformált növények specifikus PCR reakciójának gélképe. Az első oszlopban, mindkét sorban molekulatömeg marker található. 1 sor, 2-13. oszlop: pozitív (3, 5, 7, 12, 13) és negatív (2, 4, 6, 8, 9, 10, 11) transzgénikus jelöltek mintái. A 2. sor 2-7. oszlopában negatív (2, 3, 4) és pozitív (5, 7) jelölt minták láthatók. Egy üresen hagyott zsebet követően az utolsó három minta: - kontroll növényi minta (9); blank (10), plazmid kontroll (11).

5. MEGVITATÁS

(KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

Az utóbbi évek kutatásainak eredményeként egyre több információval rendelkezünk gazdasági növényeink genetikai információját illetően. A nagy genom projektek során meghatározott DNS szekvenciák adatait azonban értelmezni kell a genetikai anyag (gének) funkcióját illetően. Nagy feladat elé állítja a növénygenetikával foglalkozó kutatókat a genetikai információban rejlő funkciók felderítése. Különös jelentőséggel bírnak a mezőgazdaság és az ipar számára is hasznosítható génfunkciók. A mezőgazdasági gyakorlat számára kiemelten fontos tulajdonságok legtöbbször komplex, több gén által meghatározott jellegek (pl. szárazságtűrés, biotikus ellenálló-képesség, fagytűrés, stb.), ezért szükség van a gének nagy számának a tesztelésére. A nagyteljesítményű tesztrendszerekkel nagy valószínűséggel megállapítható, hogy mely géneknek lehet hatása bizonyos élettani funkcióban, azonban ekkor még csak felületes információval rendelkezünk egyes géneket illetően. Az általunk kidolgozott módszer - amellett, hogy segítségével gének százait elemezhetjük - információt szolgáltat a komplex tulajdonság bizonyos részterületére vonatkozóan. Az így szerzett adatok birtokában kiválaszthatjuk azokat a géneket, melyeket részletesebb tesztelésnek vetünk alá. Ilyen részletes génfunkció-vizsgálat végrehajtható transzgénikus növények előállításával, a gének kikapcsolásával, vagy túltermeltetésével. A dolgozat második felében leírt stabil transzformációs kísérletek eredményei ehhez nyújtanak kísérleti alapot.

5.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer egyedi génfunkció vizsgálatára

A funkcionális genomikai megközelítések megkövetelik a fenomikai eszközök elérhetőségét. Fontos a mennyiségi tulajdonságok nagy áteresztőképességű értékelése, melyhez a természetes és indukált genetikai variációk adnak megfelelő alapot. Az itt leírt dehidratációs stresszben használt TIGS rendszer, az árpában már egy második fenomikai eszköz, a lisztharmat elleni védekezésben érdekelt gének tesztelésére létrehozott tranziens vizsgálati rendszer után (Douchkov és mtsai. 2005). A most már rendelkezésre álló két TIGS szűrő eszköz lehetővé teszi több száz, akár néhány ezer gén tesztelését a dehidratáció toleranciában, vagy a patogén rezisztenciában betöltött lehetséges szerepének tisztázását. Fontos, hogy ez a cél közvetlenül elérhető a célzott növényfaj adott fajtáján anélkül, hogy szükség lenne modell rendszerek

alkalmazására, mint például a *Nicotiana benthamiana*, az *Arabidopsis thaliana,* emlős sejtvonalak vagy élesztő, ahol már nagy áteresztőképességű fenomikai eszközök állnak rendelkezésre (Warringer és mtsai. 2003, Brigneti és mtsai. 2004, Silva és mtsai. 2004, Devi és mtsai. 2006).

5.1.1. A tranziens indukált géncsendesítési rendszer (TIGS) használatával elérhető teljesítmény

A tesztrendszerek információszolgáltató-képességén kívül fontos paraméter az egy személy által, időegység alatt tesztelhető gének száma. A TIGS rendszer jelenlegi áteresztőképessége dehidratációs stresszben érdekelt gének tesztelésére kb. 40 gén/fő/hónap. Mindemellett lehetőség van a rendszer áteresztőképességének további növelésére a mikroszkópos vizsgálatok robotizálásával, mint az már megvalósult a TIGS szűrés betegségrezisztenciában való alkalmazásakor (Ihlow és mtsai. 2008). A kifejlesztett tesztrendszer egyedi sajátosságából adódóan jelentős mikroszkópi hátteret igényel. A fluoreszkáló transzformált sejtek automatikus képfelismerő rendszerek által történő számlálása jelentős kiegészítése lehet a TIGS rendszernek, azonban az esetenként erős autofluoreszcencia jelenleg nagy kihívást jelent a hisztokémiai festéssel jelölt GUS expresszáló sejtek automatikus detektálásához képest. Személyenként havonta 80-100 gén tesztelését reálisan megvalósíthatónak tartjuk, abban az esetben, ha az RNAi vagy túltermelő konstrukciók már készen állnak a transzformációhoz. Mindent egybevetve, a TIGS rendszert a dehidratációban érdekelt gének tesztelésére közepes vagy nagy áteresztő képességű tesztrendszerként jelölhetjük meg, különösen, ha összehasonlítjuk más, árpában használt funkcionális genomikai eszközökkel, mint pl. a TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) vagy a transzgénikus növények előállítása, melyek becsült áteresztőképessége 1 gén/fő/hónap fenotipizálással együtt (Caldwell és mtsai. 2004, Zhao és mtsai. 2006).

5.1.2 A tranziens indukált géncsendesítési rendszer (TIGS) értékei és korlátai

A dehidratációs stressz-toleranciára szolgáló TIGS rendszer génfunkciók felderítésében lehet hatékony eszköz az aszállyal összefüggő probléma néhány szempontjára vonatkozóan. E speciálisan géncsendesítési konstrukciókkal kidolgozott rendszerrel komplementáció, vagy tranziens overexpressziós vizsgálat ugyanúgy végrehajtható tranziens, egyedi sejt rendszerben.

Először is e rendszerrel nem tesztelhetők az elkerüléssel kapcsolatos jellemvonások, mint az epikutikuláris viaszréteg vastagsága és összetétele, vagy a sztómazáródás. Mivel a célzott géneket csak az egyedi epidermisz sejtekben hallgattatjuk el, nem tudunk olyan géneket sem tesztelni, amelyek az oldott anyagok mobilizálásában játszanak szerepet.

Tesztrendszerünk azonban képes feltárni a sejtes túlélést, fehérjék védelmét a denaturációtól és károsodástól, valamint az enzimatikus fehérje lebomlást. Valószínűleg mind a vízvesztés, mind a reaktív oxigén fajták (pl. H_2O_2) felhalmozódása gátolhatja a DsRed kialakulást. Jelenleg még nem tisztázott, hogy e stressz következmények közül melyek a legártalmasabbak, mivel a protektív gének nagy hányadát még nem tesztelték egyenként ezekre a következményekre.

Korlátozott számú- korábbi ismeretek alapján jól jellemzett- jelölt gén felhasználásával bizonyítottuk koncepciónk helyességét a TIGS rendszer működőképességére, dehidratációs stresszelt árpában. Ezek a gének a HvDRF1 DREB2 típusú transzkripciós faktor, a HvDhn6 dehydrin, a LEA proteinek csoportjába tartozó HVA1 és a vakuolar Na^+/H^+ antiporter HvNHX1 fehérjét kódolják. Érdekes módon a HVA1 elcsendesítése, amely HvDRF1 közvetlen downstream célpontjainak egyike (Xue és Loveridge 2004), szintén a DsRed jelentős csökkenését okozta. Jelezve, hogy a TIGS rendszer elég érzékeny a génfunkciók felfedésére, nem csak a kulcs szabályozók (HvDRF1) előre látható episztatikus hatása, hanem a fontos downstream védelmi fehérjék esetén is. A HvDRF1 mRNS alapszinten elég magas értéken volt jelen, de tranziensen elcsendesítve nem csökkentette a DsRed fluoreszcenciát a nem stresszelt levelekben. Ez azt sugallja, hogy a HvDRF1 protein poszt-transzlációs aktiváción megy keresztül a stressz során, vagy a korábban meglevő funkcionális fehérjének nincs háztartási (housekeeping) funkciója a sejtekben. A HVA1 csendesítés hatása nem volt meglepő, mert ezt a gént, mint aszálytűrést fokozó gént jellemezték a transzgénikus megközelítésű kísérletek egész sorában, különböző növényfajoknál, ideértve a búzát is (Xu és mtsai. 1996, Bahieldin és mtsai. 2005, Fu és mtsai. 2007). A HvNHX1 aszálytűrésre gyakorolt kedvező hatását szintén igazolták transzgénikus növényekben (Fukuda és mtsai. 2004). A HvDRF1 és HvDhn6 csendesítésének itt kimutatott hatása elsőként demonstrálja a kódolt fehérjék védő funkcióját, habár korábban már kimutatták más dehydrinek védő hatását enzim aktivitásban *in vitro* (Reyes és mtsai. 2005). Összefoglalva, e négy funkcionálisan jellemzett jelölt gén segítséget jelent az árpa molekuláris markerfejlesztésben, koszegregáció tesztelésére és az aszálytűrés QTLekkel való kapcsoltságának kimutatására árpa térképezésben, illetőleg kapcsoltság-genetikai populációkban. A TIGS egy további ígéretes felhasználási lehetősége lenne transzgénikus árpa növények előállítása, melyek a megfelelő RNAi konstrukciókat vagy a szárazságtűrő genotípusok introgresszált gén haplotípusát hordozzák. Az itt tesztelt gének kis csoportja a DREB2 típusú és a Dhn multigén család kettő, illetőleg három tagját

tartalmazta. Mindazonáltal géncsaládonként már egy RNAi konstrukció is jelentős fenotípusos hatást mutatott.

Ez megnyitja a lehetőséget a TIGS rendszernek multigén családok (pl. Dhn vagy CBF) szisztematikus elemzésére árpában, hogy tisztább képet kapjunk az egyedi gének élettani szerepéről. Mindazonáltal, a család méretű TIGS megközelítések egy kifinomultabb konstrukciótervezést igényelnének annál, amit itt alkalmaztunk. Mert mind a három RNAi konstrukcióról, amelyek Dhn géneket céloznak meg, úgy találtuk, hogy nagyrészt átfedő sajátosságaik vannak, ahogy azt az "siRNA Scan" számítógépes program is kimutatta (Xu és mtsai. 2006). Úgy látszik, hogy valószínűleg a három Dhn-RNAi konstrukció különböző fenotipikus hatása a különböző RNAi hatékonyságnak volt köszönhető. Ez lehetségesnek tűnik, mert a célszekvenciák nagyrészt nem voltak átfedők (adatok nincsenek feltüntetve). A HvDhn8 –ra tervezett RNAi konstrukció szintén csak statisztikailag nem szignifikáns hatást mutatott, köszönhetően az üres vektor kontroll adatok nagyobb szórásának, ezért ezek valószínűleg fals negatív eredmények. A TIGS rendszer áteresztőképessége lehetővé teszi, hogy olyan jelölt gének sorát teszteljük, melyeket vízhiány vagy aszály stresszelt árpában upreguláltként publikáltak. Ez lehetővé teszi, hogy elkészítsük a dehidratáció toleranciát megalapozó, és így az árpa extrém szárazságtűrését meghatározó gének első funkcionális leltárát (Talame és mtsai. 2007). A DsRed alapú TIGS rendszert a jövőben érdemes lehet még kiterjeszteni árpa hidegtűrés tesztelésére is. Az árpa nemcsak gazdaságilag jelentős, hanem modell növény is, kiemelt fontosságú a bonyolultabb genom-szerkezetű búza kutatásához.

5.2. Genetikai alapanyagok létrehozása stabil genetikai transzformációval funkcionális genomikai kísérletekhez

Az egyes gének funkciójának felderítésében a mutánsok elemzése mellett, a gének genetikai transzformációjával (elcsendesítésével vagy overexpressziójával) szerezhetjük a legátfogóbb képet. Dolgozatom második fele a biotikus és abiotikus rezisztenciával kapcsolatban végzett transzgénikus növény-előállítás eredményeiről szól. A három transzformációs kísérlet génjei a *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz gén, melynek az abiotikus stressztűrőképesség fokozásában van jelentősége (Oberschall és mtsai. 2000). A búza Mlo génjének elcsendesítése, az árpában régóta ismert mlo lisztharmat-rezisztencia mintájára került a figyelem középpontjába. A búza levélrozsda fokozására transzformált NBS-LRR típusú rezisztenciagének szerkezeti hasonlóságuk alapján perspektivikusak stabil transzformációs kísérletekhez.
A genetikai transzformációkhoz ma már a módszerek bőséges választéka áll rendelkezésre. Ezek közül az egyszikű transzformációban csupán az *Agrobacterium* által közvetített és a közvetlen, részecskebelövésen alapuló

módszer terjedt el. Az agrobaktériumos transzformáció számos előnye ellenére a közvetlen génbeviteli módszer mellett döntöttünk. A nemzetközi szakirodalom által publikált adatok megerősítik tapasztalatainkat, a részecske-belövéses transzformációval elérhető transzgénikus növény hozam meghaladja az agrobaktériumos transzformáció hozamát. A két módszer előnyeit és hátrányait mérlegelve, (Vasil 2007, Altpeter és mtsai. 2005) döntésünket a belövéses transzformációval kapcsolatos évtizedes módszertani tapasztalatunk birtokában hoztuk meg.
Mindhárom transzformációs kísérletben az intakt, jelölt növények permetezésére 0,5-1%-os Finale 14 SL permetszert használtunk, amelynek gyári kiszerelése 14 % PPT hatóanyag tartalmú. Tehát a felhasznált permetszer 700-1400 mg/l PPT hatóanyagot tartalmazott. Az *in vitro* szelekció során 5-20 mg/l dózist alkalmaztunk. A módszer lényegéből adódóan előfordult, hogy a növények a transzgént tekintve szöveti szinten mozaikosak voltak, un. kimérák, melyek egyaránt tartalmaztak transzgénikus és nem transzgénikus szöveteket. A különböző arányban találtunk un. megmenekült növényeket, melyek a szelekciós szakaszt túlélve regenerálódtak, de nem hordozták a transzgént. A permetezést követően néhány esetben előfordult, hogy a több hajtású növények egyik fele elhalt, a transzgént hordozó hajtások viszont túlélték a permetezést.

Azt is fel kell vetnünk, hogy a PPT szelekció nem a legkedvezőbb szelekciós rendszer, vannak megszökő növények. Néhány évvel ezelőtt, amikor még kapható volt a Bialaphos,- mely sokkal alkalmasabb volt szelekcióra - kevesebb volt a megmenekült növények száma. Sajnos ma már nem lehet ehhez hozzájutni.
A transzformációval létrehozott összesen 78 transzgénikus vonal használható alap az átfogó funkcionális vizsgálatok elvégzéséhez.

5.2.1. Az Mlo gén csendesítésére irányuló genetikai transzformáció

A stabil genetikai transzformációval létrehozott növények esetén egyre nagyobb ellenállás mutatkozik a szelekcióra használt markergénekkel kapcsolatban, amennyiben ezek valamilyen antibiotikumot kódolnak. Az egyszikű transzformációkban a leghatékonyabb szelekciót lehetővé tevő antibiotikum rezisztencia gének sem engedélyezettek, ha az alapkutatáson túl gyakorlati felhasználás kerül szóba. Jogos igény tehát, a markergén-mentes transzgénikus növényi alapanyagok előállítása. Ennek megvalósítására jelenleg már több használható módszer áll rendelkezésre, pl. helyspecifikus rekombináció, homológ rekombináció, transzpozíció, kotranszformáció (Hare és Chua 2002). Az Mlo géncsendesítésre irányuló transzformációs kísérleteinkben a kotranszformációs technikával kívántuk biztosítani a következő generációk markergén-mentességét. A célgént és a szelekciós markergént két külön plazmidon juttattuk be a recipiens genomba. A markergén

és a célgén, az irodalmi adatok szerint és a saját eredményeink szerint is, együtt transzformálható. A legtöbb irodalmi adat alapján a transzgén beépülés, a külön plazmidok esetén egymástól független lokuszokra történik, ami által lehetőség van az utódgenerációkban markermentes vonalak kialakítására (Rooke és mtsai. 2003, Yao és mtsai. 2007). A transzgének öröklődése domináns jellegű volt, de a Mendeli öröklődés nem minden esetben figyelhető meg (Rooke és mtsai. 2003).

Kísérletünkben CY-45 tavaszi búza genotípus genetikai módosításával foglalkoztunk. Célul tűztük ki a búza Mlo génjét elcsendesíteni egy, az Mlo génre tervezett szekvenciákat szensz és antiszensz formában hordozó plazmidkonstrukció bejuttatásával, így poszttranszkripciós géncsendesítéssel létrehozzuk a lisztharmat elleni rezisztenciát. Kooperációs partnerünk egy vektor molekulát hozott létre, mely szensz és antiszensz orientációban tartalmazza a búza genomjában elhallgattatni kívánt gén szekvenciáját. Mivel a plazmid molekula nem tartalmaz szelektálható marker gént, ezért a géncsendesítésért felelős plazmidunkat együtt transzformáltuk a *bar* gént hordozó, pAHC20 plazmid molekulával, amellyel korábban már mások, (Vasil és mtsai 1992, Becker és mtsai 1994) és saját laboratóriumunk (Pauk és mtsai. 1998) is hozott létre transzgénikus növényeket.

A nemzetközi szakirodalomban már több, gyakorlatban is alkalmazható tranziens expresszión nyugvó tesztrendszert is ismertettek lisztharmat elleni rezisztenciában érdekelt gének genomikai szűrésére. (Douchkov és mtsai 2005; Ihlow és mtsai 2008). Eredményes stabil transzformációs kísérletekről is megjelentek már az első publikációk (Altpeter és mtsai 2005), mégis búzában mindeddig nem ismertek olyan stabil transzformációs eredmények, melyek az árpában ismert mlo rezisztencia búzában való sikeres alkalmazásáról szólnak. Transzgénikus növényeink további elemzése új információkkal szolgálhat a hatékony és tartós biotikus rezisztencia kialakulásának hátteréről.

CY-45 búza genotípusunknál sikerrel indukáltunk embriogén struktúrákat és regeneráltunk gyökerező zöld növényeket. A dolgozatban bemutatott módszer szerint az éretlen embriókat helyeztünk 2 mg/l 2,4-D tartalmú táptalajra. Az 5-10 napig tartó előtenyésztés során -nagy valószínűséggel- az alig differenciálódott mezokotil és hajtásprimordiumból indul meg a kalluszfejlődés. A fiatal embriókat a hajtás és gyökérprimordiumot, és mezokotil részt tartalmazó axissal lefelé helyeztük a táptalajra. Az ideális embrióméret és fejlettség esetén ekkor jó minőségű, embriogén kalluszokat kaptunk, melyek kiváló növényregenerációs képességgel rendelkeztek. A túlságosan fejlett embriók esetén az axis eltávolítása megakadályozza ugyan az embrió kicsírázását, de tapasztalataink szerint ebből az osztódásnak indult scutellumból, már nem kapunk jó minőségű alapanyagot a transzformációs kísérletekhez. Ilyen esetben gyengébb növényregeneráló képességgel kell számolni. Célunk minél több transzgént hordozó, zöld kallusz-kolónia előállítása volt. Azokat a növényeinket, melyek megfelelően növekedtek az

üvegcsőbe helyezést követően, kiültettük az üvegházba, számukra optimális körülményeket biztosítva a további fejlődéshez. Azokat a növényeket,, amelyeknél a gyökér- és hajtásfejlődése gátolva volt- valamilyen oknál fogva- nem tudtuk kiültetni. A kiültetett növények közül az elpusztult (1,09 %), illetve életben (1,8 %) maradt növények arányát tekintve azonban megállapíthattuk, hogy a kapott eredményeink nemzetközi szinten publikált 0,1-2,0 %-os búza transzformációs eredmények fényében is jónak mondhatóak (Varshney és Altpeter 2001). A PCR eredmények alapján rendellenes 17. és 27. növényi mintáinkat a többi növénnyel együtt tovább vizsgáljuk génexpressziós szinten is, hogy van- e bennük detektálható mennyiségű, géncsendesítésben jelentős siRNS.

A *bar*, szensz és antiszensz *Mlo* szekvenciára nézve összesen 25 növényünk volt pozitív. Mivel mind a 25 növényi minta tartalmazta az együtt transzformált két különböző plazmid szekvenciáit, kijelenthetjük: a kotranszformáció hatékonysága 100%-os volt. Ezt az eredményünket, irodalmi adatok tükrében, reális eredményként értékelhetjük (Yao és mtsai. 2006). A közvetlen transzformációs módszerek és szelekciós módszereknek köszönhetően, az együtt transzformált plazmid molekulák ugyanazokba a sejtekbe kerülnek. A dolgozat első részében bemutatott tranziens transzformációs kísérletekben saját tapasztalatok alapján állíthatjuk, hogy az együtt transzformált riporter gének (RFP, DsRed) mindig ugyanazon sejtekben, együtt expresszálódtak. Az Mlo géncsendesítési kísérletek során a kotransszformáció után nem találtunk olyan növényeket, melyekben a szelektív markergén mellett nem lett volna jelen a két célgén szekvencia. A továbbiakban a külön plazmid molekulán bevitt szekvenciák együtt öröklődését az utódgenerációk elemzése után értékelhetjük. Leghatékonyabb plazmid molekula összetételnek a 4-4 µl plazmid DNS, 84 µl etanolos kotranszformáció bizonyult, itt hatékonysági százalékunk elérte az 1,1%-ot. Legkevésbé sikeres belövéses sorozatunkat a 4-4 µl DNS, 150 µl etanol hozzáadásával végeztük el, ahol hatékonysági százalékunk mindössze 0,25%-ot ért el. A különböző hígítású és plazmidarányú kotranszformációs kísérletek eredményeit mégsem értékelhetjük csupán a transzformációs hatékonyság alapján. A nagyobb hígítást alkalmazó, de kisebb hatékonyságú kísérleteink jelentősége teljes mértékben csak a génexpressziós vizsgálatok, illetve a gének kópiaszámának meghatározása után mérhető. Várakozásaink szerint nagyobb hígítást alkalmazva az egykópiás beépülések nagyobb arányban fordulnak elő. A részecskebelövés módszer egyik előnyeként jelölhetjük meg a bejuttatott DNS szakaszok pontosabb és precízebb manipulálhatóságát, mellyel befolyásolható a transzgén lokuszok minősége és struktúrája (Altpeter és mtsai. 2005). A kívánt géncsendesítés illetve rezisztencia eléréséhez feltételezéseink szerint nagyszámú siRNS jelenlétére és egy, vagy alacsony beépült kópiaszámra van szükség.

Az előállított növények utódgenerációiban a jövőben teszteljük majd, a bejuttatott gén hasadását, illetve öröklődését és detektálhatjuk az együtt transzformált szelekciós marker gén, és az *Mlo* csendesítési konstrukció szegregációját vagy együttöröklődését. Azokon a növényeken, melyek az üvegházban végzett eddigi kísérletek alapján transzgénikusnak bizonyultak, további molekuláris vizsgálatokat végzünk, a specifikus siRNS-ek jelenlétét és mennyiségét Northern hibridizációs próbával jellemezzük.

Jövőbeni munkánk megvizsgálni, hogy a génmódosítás az utódgenerációkban okoz-e mérhető kórtani változásokat, a kontroll növényekhez hasonlítva. Kísérleteink kutatási jellegűek. Szeretnénk megtudni, hogy a dolgozatban vázolt és létrehozott rendszerünk biztosít-e védekezési alternatívát a veszélyes gombabetegség, a lisztharmat ellen.

5.2.2. Stabil genetikai transzformáció *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz génnel

Kutatásunk során célként tűztük ki az Ms*ALR* gén búzába történő (*Triticum aestivum* L.) beépítését, mellyel a szárazsággal és más abiotikus stresszekkel szembeni toleranciáját kívántuk növelni. A lucernából izolált Ms*ALR* gént genetikai transzformációval építettük be a munkánk során használt CY-45 búza genotípusba.

Srivastava és mtsai (1995), valamint Vander Jagt és mtsai (1992) kutatásai szerint a különböző stresszhatások sejtkárosító hatásként lépnek fel, reaktív aldehid és keton vegyületek keletkeznek, és halmozódhatnak fel a növényben. A számos vizsgálati eredmény alapján az aldóz- reduktázoknak, ezen vegyületek kémiai átalakításán keresztül károsító hatásaik megszüntetésében lehet szerepük. A növények osztódó sejtjeiben a glioxaláz enzim (GLXI) aktivitását mérték, mely keletkezhet spontán a glikolízis és fotoszintézis során. További kísérletek, pedig bebizonyították, hogy a GLXI enzim túltermeltetése ozmotikus stresszel szembeni ellenállósághoz vezet, vagyis a metilglioxál sikeres detoxifikálása -amiben szerepe van az aldóz-reduktáznak- abiotikus toleranciához vezet (Veena és mtsai 1999).

Az MsALR gén kifejeződését hormonális és környezeti tényezők egyaránt befolyásolják. A gén megemelkedett expressziós szintet mutatott ABA hormon, valamint ozmotikus, nehézfém okozta stresszhatásokra, kiszárításra és reaktív oxigén közvetlen hozzáadására. Az izolált és vektorba épített MsALR gén transzgénikus dohány növényekben fokozott kiszáradás toleranciát okozott. (Oberschall és mtsai 2000). Legkorábbi kísérleteinkben ugyanezzel a génnel transzformált búza sejtszuszpenziós tenyészeteink, fokozott növekedést mutattak a kontroll vonalakhoz képest ozmotikus stressz körülmények között (Pauk és mtsai. 2002).

Ezt a transzformációs munkát folytattuk, kísérleteinkben eredményesen transzformáltuk az MsALR gént a CY-45 búza genotípusba. A 21 bar pozitív növényből 2 növény esetén nem sikerült kimutatni az *MsALR* gént. A permetezés hatására elpusztuló növényünket nem vetettük alá részletes molekuláris analízisnek, de irodalmi adatok alapján előfordulhat plazmidok törése, esetleg a plazmidok töredékes beépülése (Altpeter és mtsai. 2005). A 19 új, bizonyítottan transzformáns búza vonalak tesztelését folytatjuk génexpressziós szintű vizsgálatokkal, majd a gént fokozottan kifejező vonalainkat komplex stresszdiagnosztikai rendszerben kezdtük megvizsgálni (Majer és mtsai. 2008). A sikeres transzformációs események mellett, azonban mindenképpen említést érdemel, hogy a transzformációs gyakoriság némileg elmarad a dolgozatban bemutatott, többi transzformációs kísérletben elért eredménytől. Ennek okai valószínűleg a gén élettani hatásaiból, vagy a vektor különbségéből adódik, mert a transzformáció technikai körülményei és módszere ebben az esetben is megegyezett. A biotikus stressztűrés fokozására irányuló elgondolásunk jól illeszkedik az utóbbi évek kutatási trendjébe. A növények abiotikus stressztűrő-képességének fokozására a nagy munka és időigényes klasszikus nemesítési módszerek mellett, az utóbbi tíz-tizenöt évben egyre nagyobb teret hódítanak a molekuláris genetikai módszerekkel végzett próbálkozások. A stressztoleranciát biztosító gén kiválasztása, izolálása, növényekbe való bevitele és magas szintű kifejeztetése (vagy elhallgattatása) az egyik legelterjedtebb stratégia (Holmberg és Bülow 1998). A módszer alkalmazásával számos sikeres kísérletet mutattak be, bizonyítva a jelölt gének pozitív vagy negatív hatását stresszelt körülmények között (Tarczynski és mtsai. 1992, 1993, Abebe és mtsai. 2003, Sivamani és mtsai. 2000; Bahieldin és mtsai 2005, Xue és mtsai. 2004; Wu és mtsai. 2005; Huang és mtsai. 2006).

Az MsALR génnel transzformált új búza vonalainkat eddig még csak a dolgozatban leírt DNS szinten vizsgáltuk. Tervezzük ezen újonnan transzformált vonalak további tesztelését RNS és fehérje szinten is, később a GK Kft-ben működő komplex stresszdiagnosztikai rendszerben kívánjuk vizsgálni.

5.2.3. Genetikai transzformáció NBS-LRR génanalógokkal

A nemzetközi szakirodalomban eddig viszonylag kevés publikáció látott napvilágot izolált rezisztenciagének búzába történő bevitelével kapcsolatban. Transzformációs módszertani szempontból kísérleteink nem jelentettek újdonságot, mégis figyelemre méltó, hogy a transzformáció hatékonyságát tekintve problémamentesnek tűnt a gén bejuttatása. Mindegyik génanalóg transzformációja bizonyítottan transzformáns növények kiültetéséhez vezetett. A különböző kísérletekben a bejuttatási hatékonyság 0,44 és 1,71% között volt.

Hazánkban a levélrozsda, ha megfelelőek az időjárási és egyéb fertőzési körülmények, akár 20-30%-os termésveszteséget okozhat. Természetesen a védekezés megoldható vegyszeres védekezéssel is, azonban a környezet védelme megkívánja a modern molekuláris biológiai alapokon nyugvó rezisztencianemesítést is. A nemesítők rendelkezésére áll mintegy 50 levélrozsda rezisztenciagén, ezek mindeddig valóban jó szolgálatot tettek a klasszikus nemesítőknek. Az utóbbi időben, azonban egyre inkább megfigyelhető, hogy az eddig jó rezisztencia hatásfokkal rendelkező gének elvesztik hatásukat, az általuk okozott rezisztencia letörik és kevésbé hatékonyak a fertőzéssel szemben.

Általánosságban elmondható, hogy az ősi vad búza, vagy egyéb nem búzafajták, potenciális rezisztencia gén donorok lehetnek. Ezekben a növényekben rejlő lehetőségeket érdemes kihasználni. Különösen annak tudatában, hogy a rezisztenciagének közös, egymáshoz nagyon hasonló domén felépítésűek, un. NBS-LRR /nucleotid binding site leucin rich repeat/ struktúrát mutatnak. Emiatt akár a fajok közötti transzfer esetében is elképzelhető hatékony működés.

A gének fizikai azonosítása, klónozása sokkal gyorsabb és hatékonyabb nemesítést tesz lehetővé. Továbbá lehetőség van arra, hogy eddig nem ismert, azonosítatlan rezisztenciagéneket a génekben rejlő homológia alapján izolálhassunk (Dallmann 2006). Az általunk transzformált rezisztencia génanalógok is domén homológia alapján voltak kiválasztva és klónozva. A célgént expresszáló, és stabilan örökítő vonalainkat a későbbiekben kiterjedt rezisztencia vizsgálatoknak vetjük alá. Abból adódóan, hogy kórokozók nagyon széles köre ellen védelmet nyújtó reziszetenciagének tartozhatnak szerkezet szerint ugyanabba a csoportba (pl. NBS-LRR), transzgénikus vonalainkat a későbbiekben nemcsak levélrozsda, hanem más kórokozók elleni rezisztencia kapcsán is vizsgáljuk.

Transzformációs kísérleteinket, hatékonyságot tekintve sikeresnek mondhatjuk, mivel nem voltak olyan kísérletek, ahol nem sikerült DNS szinten bizonyítottan transzformáns vonalat létrehozni. Minden kísérlet hatékonysága elérte azt a szintet, mely nemzetközileg is jónak mondható búza esetében. A transzformánsok előállítása laborintenzív és munkaigényes folyamat, melyben számos tényező befolyásolja a végső sikert. Az általunk használt búza transzformációs módszerrel, kb. három hónap laboratóriumi munkát követően juthatunk üvegházi körülmények közé, talajba kiültethető transzgénikus jelölt növényekhez. A genetikai transzformációt ebből adódóan, a funkcionális genomikai eszköztárban a kis teljesítményű módszerek közé sorolhatjuk, azonban a transzgénikus növények vizsgálata által nyerhető információk miatt, mégis nélkülözhetetlen bizonyos funkciókban jelölt gének alapos és célirányos vizsgálatában.

5.3. Új tudományos eredmények

Kísérleteinket a funkcionális genomika tudományterületén végeztük. A dolgozat első felében leírt, tranziens indukált géncsendesítési rendszert – melyet közepes áteresztőképességű géntesztelési rendszerként írtunk le – és a dolgozat második felében ismertetett genetikai transzformációs kísérletek célja hasonló: új információkat kapjunk a nemesítési kutatás számára biotikus illetve abiotikus stresszhatások ellen védelmet nyújtó jelölt génekkel kapcsolatban, és növényi alapanyagot állítsunk elő a funkcionális genetikai vizsgálatokhoz. Eredményeink olyan kutatási eredmények, melyek mind hagyományos, mind modern módszerekkel felhasználhatók a biotikus és abiotikus stresszekkel szembeni kutatásban.

Kísérleteink során az alábbi új eredményeket értük el:

1. Kidolgoztunk egy közepes áteresztő-képességű tesztrendszert vízmegvonási stresszben érdekelt gének szűrésére, árpa modell növényen. A tranziensen indukált géncsendesítési rendszerben (TIGS), levágott árpa levelekben a vízhiánystresszre érzékeny DsRed marker fehérjét expresszáló sejtek száma jelezte a vízhiány súlyosságát.

2. Szakirodalmi adatok alapján kiszáradás stresszben érintett gének csendesítésével igazoltuk a kidolgozott tesztrendszer működőképességét és felhasználhatóságát a dehidratáció stresszben érintett gének tesztelésére egyedi epidermisz-sejtes rendszerben.

3. Búzában stabil genetikai transzformációs célra rutin módszerré fejlesztettük a részecske belövésen alapuló (PDS -1000He) közvetlen géntranszformációs módszert. A több idegen gén transzformálásával elért génbeviteli hatékonyság (0,16-1,71 %) nemzetközi szinten is jó eredménynek számít.

4. Sikeresen transzformáltuk a búzát (*Triticum aestivum* L.) biotikus és abiotikus stresszhatások ellen védelmet biztosító génekkel (Mlo géncsendesítési konstrukció, MsALR és NBS-LRR típusú rezisztenciagén analógok). Kísérleteink során összesen 78 független transzformáns növényt sikerült előállítani, melyeknél minden esetben DNS szinten bizonyítottuk a transzgén jelenlétét.

5. A közvetlen génbeviteli módszerrel (PDS-1000/He) transzformált növények létrehozásával genetikai forrásokat hoztunk létre a további funkcionális genetikai vizsgálatokhoz.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A modern növénygenetikai kutatás egyik fő kérdése, hogy a kutatási célunknak megfelelő génekhez fizikai közelségbe kerüljünk. Értekezésem első részében a génvadászat, egy általunk kialakított módszerét mutattam be árpa modell növényen.

A DsRed nevű vörös fluoreszcens fehérjéről ismert, hogy a levelek dehidratációs stresszben érintett sejtjeinek károsodását a protein csökkent felhalmozódása jelzi. A DsRed fehérje késői érésű, felhalmozódása a sejtekben érzékeny a stresszhatásokra. Négynapos dehidratációs stresszkezelés után (a levágott levelek relatív friss tömegét a kezdeti friss tömeg 60-66 %-án tartottuk) a normalizált DsRed fehérje reprodukálhatóan csökkent felhalmozódását észleltük. Feltevésünket bizonyítandó, számos szárazságtűréssel összefüggésbe hozható gén árpa mRNS homológját választottuk ki és próbáltuk ki a tranziens géncsendesítési rendszerben. (TIGS). Négy, TIGS rendszerben tesztelt gén eredményezett szignifikáns visszaesést a normalizált DsRed fluoreszcenciában a dehidratációs stressznek kitett leveleken, míg a teljesen turgoros kontroll leveleken nem jelentkezett hatás. Ezek a gének árpa szárazság reszponzív faktor HvDRF1 (DREB2-like), dehydrin 6, LEA protein HVA1, és vacuolar Na^+/H^+ antiporter HvHNX1 géneket kódolnak. A négy célzott transzkriptről az is kimutatható volt, hogy gyorsan fölhalmozódnak a dehidratációs stressznek kitett árpa levelekben. Az eredmények azt sugallják, hogy a TIGS rendszer eredményesen alkalmazható nagyszámú szárazság stresszben jelölt gén funkcionális tesztelésére árpában.

A genomikai és funkcionális genomikai kutatások között, az egyik tudományos híd a gének transzformációja valamilyen recipiens szervezetbe, hogy megtudjuk, ellenőrizzük – a gén túltermeltetve, elhallgattatva – a gén funkcióját. Ehhez a munkához három transzformációs project stabil genetikai transzformációját végeztük el búzába. Végső célunk a bejuttatott gének funkcionális analízise a befogadó szervezetben. Ehhez először létre kellett hozni a bizonyítottan transzgénikus búzákat. Értekezésem második felében ezt a munkát összegeztem.

A lisztharmat-rezisztenciával foglalkozók körében jól ismert rezisztencia előfordulás az árpa Mlo gén homozigóta *mlo* allélje által kódolt nem rassz-specifikus ellenálló-képesség, mely helyi sejtfalvastagodással reagál a lisztharmat fertőzés esetén. Céljaink között szerepelt egy hasonló típusú rezisztencia kialakítása búzában poszttranszkripciós géncsendesítéssel, transzgénikus növények létrehozásával a rezisztencia viszonyok tanulmányozására. Kísérletünkben a CY-45 tavaszi búza genotípus genetikai módosításával foglalkoztunk. Búza genotípusunk- kísérleti adatok alapján- lisztharmat fogékonynak ismert. A búza Mlo génjének elcsendesítésére egy, az

Mlo gén egy szakaszára tervezett szekvencia szensz és antiszensz orientációban hordozó plazmid konstrukciót (pSTARLING-A) transzformáltunk, nemzetközi viszonylatban is jónak mondható hatékonysággal. Mivel a pSTARLING-A plazmid nem tartalmazott szelektálható marker gént, ezért együtt transzformáltuk (ko-transzformáció) egy *bar* gént hordozó, pAHC20 plazmid molekulával.

A *bar* génre valamint szensz és antiszensz Mlo szekvenciára nézve összesen 25 növényünk volt pozitív. Leghatékonyabb plazmid molekula összetételnek a 4-4 µl plazmid DNS, 84 µl etanolos kotranszformáció bizonyult, itt hatékonysági százalékunk elérte az 1,1 %-ot. Az előállított transzgénikus vonalakat biotikus rezisztenciával összefüggő genetikai vizsgálatok alapanyagaiként használhatjuk fel.

Az abiotikus stressztűrő-képesség javítására és funkcionális genomikai vizsgálatára a *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz génnel végzett transzformációs kísérleteinkben sikerrel vittük át búzába mind a célgént, mind a szelekciós markergént. A PCR reakcióval végzett tesztelés után két olyan növényt találtunk, melyben a markergén jelenlétét igazoltuk, de az aldóz-reduktáz gén jelenléte nem volt igazolható. A *bar* szelekcióra épülő transzformációs rendszer sajátosságából adódóan fordított helyzet nem fordult elő. Minden aldóz-reduktáz gént hordozó növényben kimutatható volt a *bar* gén jelenléte. A kísérleteket összegezve megállapítottuk a száz belőtt embrióra jutó transzgénikus növények arányát. A különböző kísérletekben a transzformáció hatékonysága 0,16 - 1,03 %-os volt a *bar* génre nézve. A célgént tekintve 0,16 - 0,82 %-os hatékonyságot sikerült elérni.

Napjainkban fokozottan nő az igény új rezisztenciagének izolálására, majd termesztésbe vonására. Az ősi vad búza, vagy egyéb búza genotípusok potenciális rezisztenciagén donorok lehetnek. Különösen annak tudatában, hogy a rezisztenciagének közös, egymáshoz nagyon hasonló domén felépítésűek, un. NBS-LRR struktúrát mutatnak. Emiatt akár a fajok közötti transzfer esetében is elképzelhető hatékony működés. Az eddig ismeretlen funkciójú rezisztenciagének transzformációja gyakorlati jelentőségén túl, alapanyagot szolgáltat a rezisztenciagének működésével kapcsolatos további alapkutatásoknak is.

Sikeres transzformációt hajtottunk végre három különböző *T. monococcum* eredetű NBS-LRR rezisztenciagén analóggal (361, 362, 363). Sikeresen jutattuk be ezek antiszensz formában vektorba épített változatát (371, 373) a GK Tavasz tavaszi fajtába, valamint két különböző, rizs (*Oryza sativa*) eredetű NBS-LRR génanalógot juttatunk be a CY-45 genotípusba. Az összesen 3150 éretlen búza embrió transzformációja során 34 független transzformáns vonalat állítottunk elő, ami 100 transzformált embrióra vetítve 1,08 %-os átlagos hatékonyságnak felelt meg. A *Triticum monococcum* eredetű rezisztencia analóg gének szensz orientációjú bevitele egy kísérletben elérte az 1,78 %-os hatékonyságot.

Transzformációs kísérleteink során összesen 78 független transzgénikus búza vonalat állítottunk elő, melyek a továbbiakban funkcionális genomikai vizsgálatokban szolgálhatnak információkkal a biotikus, illetve abiotikus stressztűréssel kapcsolatban.

7. SUMMARY

One of the main issues of modern plant genetics research is to come into physical contact with genes corresponding to our research objectives. In the first part of my thesis I will introduce one method of gene hunting developed by our group on barley as a model plant.

Cellular stress or damage in dehydrated leaves is reported by a reduced accumulation of slowly maturing, native red-fluorescing protein DsRed that is known to be sensitive to denaturing conditions. After a dehydration-stress period of four days during which the relative fresh weight of leaves was kept at 60-66% of initial fresh weight, a reproducible reduction of normalized DsRed fluorescence was observed. In order to obtain proof of concept, a number of barley mRNAs homologous to drought-response genes were selected and targeted by transient-induced gene silencing (TIGS). TIGS of four tested genes resulted in a significantly stronger decrease of normalized DsRed fluorescence in dehydration-stressed leaves, whereas they had no effect in fully turgescent control leaves. These genes encode barley drought-responsive factor HvDRF1 (DREB2-like), dehydrin 6, late-embryogenesis-abundant protein HVA1, and the vacuolar sodium/proton antiporter HvHNX1. The four targeted transcripts were also found to rapidly accumulate in dehydration-stressed barley leaf segments. The results suggest a value of the TIGS system for functional pre-screening of larger numbers of drought or dehydration stress-related candidate genes in barley.

A link between genomic and functional genomic research is the transformation of genes into a recipient organism and the overproduction or silencing of the gene, in order to identify the gene function. In this study we carried out wheat stabile transformation experiments in three different projects. Our main aim was the functional analysis of the transformed gene in the recipient organism. The first step for achieving this aim was the production of transgenic wheat lines. This work is summarized in the second half of the thesis.

The broad spectrum resistance coded by the Mlo gene's homozygous *mlo* allele causing a non race-specific resistance is well-known as a common resistance source for powdery mildew. In case of infection these genotypes react with a thickened cell wall at infection site. One of our aims was to develop a similar type resistance in wheat by posttranscriptional silencing, producing transgenic plants for studying resistance effects. We used CY-45 spring wheat genotype in our experiments. Experimental data showed this genotype to be powdery mildew sensitive. In order to the silencing the wheat Mlo gene, we transformed a plasmid construction designed to a sequence of the Mlo gene in

sense and antisence orientation (pSTARLING-A) with a good efficiency in international comparison. Since the pSTARLING-A plasmid did not contain a marker gene for selection we co-transformed with a plasmid molecule containing the *bar* gene (pAHC20) as selectable marker.

We obtained 25 plants which were positive for both *bar* gene and sense and antisense Mlo sequences. The most effective (1,1% transformation efficiency) plasmid constitution could be reached by using 4-4 µl plasmid DNA and 84 µl etanol for co-transformation. The generated transgenic lines can be used for genetic experiments on biotic resistance.

For ameliorating and functional genomic testing of abiotic stress resistance, we introduced the *Medicago sativa* derived aldose reductase gene into wheat along with a marker gene for selection. PCR testing of the plants showed that there were two plants where the marker gene was present in the absence of aldose reductase gene. The reverse situation could not occur resultant from the transformation system based on selection for *bar* gene. All plants containing aldose reductase gene contained *bar* gene, too. Summarizing the results, we determined the rate of transgenic plants for every hundred bombarded embryos in each experiment. Transformation efficiency ranged from 0.16-1.03% for *bar* gene and 0.16-0.82% for target gene.

Recently there is a growing interest in isolating new resistance genes and their integration into breeding. Wild ancestor of wheat or other species different from wheat could serve as potential resistance gene donors, especially because resistance genes share a common, similar domain structure, the so-called NBS/LRR structure. Therefore effective functioning can be achievable even in case of interspecific transfers. Transformation of resistance genes with a so far unknown function - besides its practical importance - can serve as basic material for further experiments concerning functioning of resistance genes.

We performed successful transformations with three NBS-LRR resistance gene analogues of different origin from *T. monococcum* (361, 362, 363). Antisense orientation of these same constructs was successfully transformed (371, 373) in GK Tavasz spring wheat genotype and two different NBS-LRR gene analogues derived from rice (*Oryza sativa*) were introduced to CY-45 genotype. The transformation of 3150 immature wheat embryos resulted in the production of 34 independent transformant lines, with a transformation efficiency of 1, 08 %. In case of *Triticum monococcum* origined NBS-LRR gene analogue transformation in sense orientation the transformation frequency reached the 1,78 % frequency. It was our best transformation result.

In our transformation experiments, we produced altogether 78 independent transgenic wheat lines, which can serve further on as information sources on biotic and abiotic stress resistances in functional genomic experiments.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003): Tolerance of mannitol accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. Plant Physiology 131:1748-1755

Ahlandsberg S, P. Sathish, C. Sun, C. Jansson, (2001): A set of useful monocotyledon transformation vectors Biotechnology Letters 23: 1871–1875

Alpeter F., Vasil V., Srirastava V. Stöger E. Vasil I. K. (1996): Accelerated production of transgenic wheat (Triticum aestivum L.) plants. Plant Cell Rep., 16:12-17

Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooibroek H, Nicholson L, Nguyen TT, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Nigel T, Visser R (2005): Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. Mol Breed 15:305–327

Altpeter F, Varshney A, Abderhalden O, Douchkov D, Sautter C, Kumlehn J, Dudler R, Schweizer P (2005): Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance. Plant Mol Biol 57:271–283

Anker CC, Buntjer JB, Niks RE (2001): Morphological and molecular characterisation confirm that Triticum monococcum s.s. is resistant to wheat leaf rust. Theor Appl Genet 103 (6-7): 1093-1098

Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ (2003): Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola over-expressing a mitochondrial citrate synthase. Plant Physiol 132:2205–2217

Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C (2002): Plant breeding and drought in C-3 cereals: What should we breed for? Annals of Botany 89:925-940

Ayliffe MA, Lagudah ES (2004): Molecular Genetics of Disease Resistance in Cereals Annals of Botany 94: 765–773,

Bahieldin A, Mahfouz HT, Eissa HF, Saleh OM, Ramadan AM, Ahmed IA, Dyer WE, El-Itriby HA, Madkour MA (2005): Field evaluation of transgenic wheat plants stably expressing the HVA1 gene for drought tolerance. Physiologia Plantarum 123:421-427

Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2000): Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:11984-11989

Barrs HD, Weatherley PE (1962): A 1 Re-Examination of Relative Turgidity Technique for Estimating Water Deficits in Leaves. Australian Journal of Biological Sciences 15:413-418

Bartels D, Engelhardt K, Roncarati R, Scneider K, Rotter M, Salamini F (1991): An ABA and GAmodulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein EMBO JOURNAL 10**:**1037-1043

Becker D. Brettschneider R. Lörz H. (1994): Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. The Plant Journal, 5: 299-307.

Bertani, G. (1951): Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. J. Bacteriol. 62:293-300

Bittencourt P, Csányi Á, Jenes B (1995): Evaluation of different parameters and their influence on the PEG (Polyethylene glycol) mediated gene transfer into rice (Oryza satica L.) protoplasts. Cereal Research Communications 23: 359-365

Bliffeld M, Mundy J, Potrykus I, Futterer J (1999): Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. Theor Appl Genet 98:1079–1086

Blowers LE, Stormonth DA, Bray CM (1980): Nucleic-acid and protein-synthesis and loss of vigor in germinating wheat embryos Planta 150: 19-25

Bogdanove AJ. (2002): Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. Plant Molecular Biology 50: 981–989.

Burgyán J (2006): Virus Induced RNA silencing and suppression: Defence and Counter defence. Journal of Plant Pathology 88, 233-244.

Brigneti G, Martin-Hernandez AM, Jin HL, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JDG (2004): Virus-induced gene silencing in Solanum species. Plant Journal 39:264-272

Broin M, Rey P (2003): Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. Plant Physiology 132:1335-1343

Caldwell DG, McCallum N, Shaw P, Muehlbauer GJ, Marshall DF, Waugh R (2004): A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (Hordeum vulgare L.). Plant Journal 40:143-150

Cattivelli L, Baldi P, Crosatti C, Di Fonzo N, Faccioli P, Grossi M, Mastrangelo AM, Pecchioni N, Stanca AM (2002): Chromosome regions and stress related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae. Plant Molecular Biology 48:649-665

Chaerle L, Saibo N, Van der Straeten D (2005): Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency Trends in Biotechnology 23 308-315

Chen WP, Gu X, Liang GH, Muthukrishnan S, Chen PD, Liu DJ, Gill BS (1998): Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. Theor Appl Genet 97:1296–1306

Chen WP, Gu X, Liang GH, Muthukrishnan S, Chen PD, Liu DJ, Gill BS (1998): Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. Theor Appl Genet 97:1296–1306

Chia LS, Mayfield CI, Thompson JE (1984): Simulated acid rain includes lipid-peroxidation and membrane demage in foliage Plant Cell and Environment 7: 333

Choi DW, Zhu B, Close TJ (1999) The barley (Hordeum vulgare L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv Dicktoo. Theoretical and Applied Genetics 98:1234-1247

Chong K. – Bao S. – Xu T. – Tan K. – Liang T. – Zeng J. – Huang H. – Xu J. – Xu Z. (1998): Functional analysis of the ver gene using antisense transgenic wheat. Physiol. Plantarum, 102:87-92.

Christensen A.H., Sharrock R.A. and Quail P.H. (1992): Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mol. Biol., 18: 675-689.

Dai S. Carcamo R. Zhang Z. Chen S. Beachy R. N. (2001): The bacterial cytosine deaminase gene used as a conditional negative selection marker in transgenic rice plants. Plant Cell Rep., 20:738-743.

Dallmann G. (2006): Új rezisztenciaforrások és –gének In: Dudits D: A búza nemesbítésének tudománya 300-302. MTA Szegedi Biológiai Központ-Winter Fair, 2006.

De la Fuente JM, Ramirez-Rodriguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (1997): Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. Science 276:1566–1568

Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H (2004): Engineering high-level aluminum tolerance in barley with ALMT1 gene. Proc Natl Acad Sci USA 101:15249–15254

Desikan R, Cheung MK, Clarke A, Golding S, Sagi M, Fluhr R, Rock C, Hancock J, Neill S (2004): Hydrogen peroxide is a common signal for darkness- and ABA-induced stomatal closure in Pisum sativum Functional Plant Biology 31: 913-920

Devi SR, Chen X, Oliver DJ, Xiang CB (2006): A novel high-throughput genetic screen for stress-responsive mutants of Arabidopsis thaliana reveals new loci involving stress responses. Plant Journal 47:652-663

Dhindsa RS, Plumbdhindsa P, Thorpe TA, (1981): Leaf senescence – correlated with increased levels of membrane-permeability and lipid-peroxidation, and decreased levels of superoxide-dismutase and catalase Journal of Experimental Botany 32 : 93

Diab AA, Teulat-Merah B, This D, Ozturk NZ, Benscher D, Sorrells ME (2004): Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. Theoretical and Applied Genetics 109:1417- 1425

DiMaio J. J., Shillito R. D. (1989): Cryopreservation technology for plant cell cultures. Journal of Tissues Culture Methods, 12:163-169.

Dong WB, Nowara D, Schweizer P (2006): Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. Plant Cell 18:3321-3331

Douchkov D, Nowara D, Zierold U, Schweizer P (2005): A high-throughput gene silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. Molecular Plant-Microbe Interactions 18:755- 761

Dudits D, Nemeth G, Haydu Z (1975): Study of callus growth and organ formation in wheat (Triticum aestivum) tissue cultures Canadian journal of botany 53: 957-963

Dudits D. (2003): A génkutatás-genomika szerepvállalása a növények nemesítésében. Magyar Tudomány, XLVIII. kötet, 10: 1263-1272.

Espartero J, SanchezAguayo I, Pardo JM (1995): Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; Upregulation by stress Plant Molecular Biology 29: 1223-1233

Fauillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublat A, Keller B (2003): Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (Triticum aestivum L.) genome. PNAS USA 100: 15253-15258

Felföldi K., Purnhauser L. (1992): Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. Cereal Res. Commun., 20:273-277.

Fire A. (1999): RNA-triggered gene silencing. Trends Genet., 15:358-363.

Flor HH (1971): Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9: 275–296.

Fu DL, Huang BR, Xiao YM, Muthukrishnan S, Liang GH (2007): Overexpression of barley hva1 gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance. Plant Cell Reports 26:467-477

Fukuda A, Chiba K, Maeda M, Nakamura A, Maeshima M, Tanaka Y (2004): Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for

the vacuolar H+-pyrophosphatase, H+-ATPase subunit A, and Na+/H+ antiporter from barley. Journal of Experimental Botany 55:585-594

Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress Plant Science 121: 151-159

Gao SQ, Xu HJ, Cheng XG, Chen M, Xu ZS, Li LC, Ye XG, Du LP, Hao XY, Ma YZ (2005): Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor GmDREB of soybean (Glycine max). Chinese Science Bulletin 50:2714-2723

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, et al. (2002): A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). Science 296: 79–92.

Golovkin M. V. Ábrahám M. Mórocz S. Bottka S. Fehér A. Dudits D. (1993): Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. Plant Sci. Limerick, 90:41-52.

Grant S. R. (1999): Dissecting the mechanisms of posttranscriptional gene silencing: divide and conquer. Cell, 96:303-306.

Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldridge KK, Tsien RY (2000): The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:11990-11995

Haldrup A. Petersen S. G. Okkels F. T. (1998): Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used int he food industry. PLant Cell Rep., 18:76-81.

Hammond S. M. Caudy A. A. – Hannon G. J. (2001): Post transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nat. Rev. Genet., 2:110-119.

Hare P D,Chua N H (2002): Excision of selectable marker genes from transgenic plants Nature Biotechnology 20:575-580

Hartung W, Sauter A, Hose E (2002): Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? Journal of Experimental Botany 53: 27-32

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995): Improved Green Fluorescence Nature 373: 663-664

Heszky L. Dudits D. (1999): Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest 35.; 37.; 218-220.; 227-228.

Heszky L. Mesch J. (1976): Another culture investigation in cereal gene bank collection. Z. Pflenzenzüchtunkg, 77:187-197.

Heszky L. (1999): A magyar növénynemesítés jövője és a géntechnológia. Mag, 1: 9-11.

Hetherington AM, Woodward FI (2003): The role of stomata in sensing and driving environmental change Nature 424 901-908

Hiei Y. Ohta S. Komari T. Kumashiro T. (1994): Efficient transformation of rice (Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of th T-DNA. Plant J., 6:271-282.

Hoekenaga OA, Maron LG, Pineros MA, Cancado GMA, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T, Matsumoto H, Yamamoto Y, Koyama H, Kochian LV (2006): AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 103:9738–9743

Holmberg N, Bulow L (1998): Improving stress tolerance in plants by gene transfer Source: Trends in Plant Science 3: 61-66

Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA, Simonneau T, Thibaud JB, Sentenac H (2003): The Arabidopsis outward K+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration PNAS 100: 5549-5554

Hornok L. (2004): Kölcsönhatás növények és kórokozó gombák között. Magyar Tudomány, 10:1095-1107.

Huang L, Brooks SA, Li WL, Fellers JP, Trick HN, Gill BS, (2003): Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. Genetics 164:655-664

Huang S, Spielmeyer W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, Munns R (2006): A sodium transporter (KHT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. Plant Physiol 142:1718–1727

Huettel B, Santra D, Muehlbauer FJ, Kahl G (2002) Resistance gene analogues of chickpea (Cicer arietinum L.): isolation, genetic mapping and association with a Fusarium resistance gene cluster. Theor Appl Genet 105:479-400

Hückelhoven R. – Fodor J. – Preis C. – Kogel K. H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. Plant Physiol, 119:1251-1260.

Hull R, Davies JW (1992): Approaches to nonconventional control of plant-virus diseases Critical Reviews in plant Sciences 1: 17-33

Ihlow A, Schweizer P, Seiffert U (2008): A high-throughput screening system for barley/powdery mildew interactions based on automated analysis of light micrographs. Bmc Plant Biology 8

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

Jefferson, R.A., (1987): Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5, 387–404.

Jelenska, J., Tietze, E., Tempe, J., Brevet, J., (2000): Streptothricin resistance as a novel selectable marker for transgenic plant cells. Plant Cell. Rep. 19, 298–303.

Jenes, B., Bittencourt, P.A.L., Csányi, A., Pauk, J., Nagy, I., Toldi, O., Balázs, E. (1996): The GENEBOOSTER - a new microparticle bombardment device - for genetic transformation of plants. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 2: 42-51.

Jez J.M. Bennett M.J. Schlegel B.P. Lewis M. Penning T. M. (1997): Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily Biochem. J.326: 625-636

Jongedijk E, Tigelaar H, J Roekel, SA. Bres-Vloemans, I Dekker, Peter J. M. Elzen, B J. C. Cornelissen LS. Melchers (2004): Synergistic activity of chitinases and β-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85: 173-180

Jordan M.C., Qureshi J.A., Chibbar R.N., Kartha K.K., Rodrigue D., Fromm M.E., (1995): Genetic engeneering of wheat for glyphosate tolerance. Abstracts Conference on Value-Added Cereals Through Biotechnology, Plant Biotechnology Institute, National Research Council of Canada, Saskatoon, SK, Canada, pp.1-95.

Karim S, Aronsson H, Ericson H, Pirhonen M, Leyman B, Welin B, Mantyla E, Palva ET, Van Dijck P, Holmstrom KO (2007): Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. Plant Molecular Biology 64:371-386

Karunaratne S, Sohn A, Mouradov A, Scott J, Steinbiss H, Scott KJ (1996): Transformation of wheat with the gene encoding the coat protein of barley yellow mosaic virus. Aust J Plant Physiol 23:429–435

Khachatourians GG, McHughen A, Scorza R, Nip W. K., Hui Y H, (2002): Transgenic plants and crops Marcel Dekker Inc. New York, Basel

Kiraly Z (1972): Hypersensitivity as a consequence, not cause, of plant resistance to infection Nature 239 : 456

Kloti A. (1993): Gene transfer by electroporation into intact scutellum cells of wheat embryos Plant Cell Reports 12:671-675.

Koncz C, Olsson O, Langridge WHR, Schell J, Szalay AA (1987): Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants PNAS 84: 131-135

Kumar GBS, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA (2005): Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants PLANTA 222 (3):484-493

Kunkel, T., Chan, Y.-S., Chua, N.-H., (1999): Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. Nat. Biotechnol. 17, 916–919

Laursen C. M. – Krzyzek R. A. – Flick C. E. – Anderson P. C. – Spencer T. M. (1994): Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. Plant Molecular Biology, 24:51-61.

Lörz H., Baker B., Schell J. (1985): Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. Mol. Genet., 199: 178-182.

Majer P, L Sass, T Lelley, L Cseuz, I Vass, D Dudits, J Pauk (2008): Testing drought tolerance of wheat by a complex stress diagnostic system installed in greenhouse. Acta Biologica Szegediensis Volume 52(1): 97-100.

Marsan P. A. Lupotto E. Locatelli F. Qiao Y. M. Cattaneo M. (1993): Analysis of stable events of transformation in wheat via PEG-mediated DNA uptike into protoplasts. Plant Scinece, 93:85-94.

Matzke M. A. Matzke A. J. M. (1995): How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? Plant Physol, 107:679-685.

McIntosh R, Devos K, Dubcovsky J, Rogers W, Morris C, Appels R, Anderson O (2005): Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 Supplement. http://www.shigennigacjp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2005pdf

Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang HH, Michelmore RW (2003): Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. Plant Cell 15:809-834

Miki B. McHugh S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. Journal of Biotechnology, 107:193-232

Millar, A.J., Short, S.R., Hiratsuka, K., Chua, N.H., Kay, S.A., (1992): Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants.

Moran JF, Becana M, Iturbeormaetxe I, Frechilla S, Klucas RV, Apariciotejo P (1994): Drought induces oxidative stress in pea-plants Planta 194: 346

Mórocz S. Donn G. Németh J. Dudits D. (1990): An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. Theor. Appl. Genet., 80, 721-726.

Napoli C. Lemieux C. Jorgensen R. (1990): Inroduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in resersible cosuppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2:279-289.

Nehra N. S. Chibar R. N. Leung N. Caswell K. Mailard L. Steinhauser L. Baga M. Kartha K. K. (1994): Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissue following microprojectile bombardment with distinct gene construct. Plant J., 5:285-297.

Nosticzius Á. (1992): Agrokémia és növényvédelmi kémia. Mezőgazda Kiadó, Budapest 273-274.

Oberschall A, Deak M, Torok K, Sass L, Vass I, Kovacs I, Feher A, Dudits D, Horvath GV (2000): A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. Plant Journal 24: 437-446

Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK (2007): Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. Plant Biotechnology Journal 5:646-656

Oldach KH, Becker D, Lorz H (2001): Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. Mol Plant Microbe Interact 14:832–838

Omirulleh S. Ábrahám M. Golovkin M. Stefanov I. Karabaev M. K. Mustardy L. Mórocz S. Dudits D. (1993): Activity of chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast derived cells and transgenic plants in maize. Plant Mol. Biol., 21:415-428.

Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., De Wet, J.R., Helinski, D.R., Howell, S.H., (1986): Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. Science 234, 856–859

Panstruga R (2004): A golden shot: how ballistic single cell transformation boosts the molecular analysis of cereal-mildew interactions. Molecular Plant Pathology 5:141-148

Panstruga R, Kim MC, Cho MJ, Schulze-Lefert P (2003): Testing the efficiency of dsRNAi constructs in vivo: A transient expression assay based on two fluorescent proteins. Molecular Biology Reports 30:135-140

Park S, Li JS, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang HB, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005): Up-regulation of a H+-pyrophosphatase (H+-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of **the United States of America 102:18830-18835**

Pauk J, F Ertugrul, T. Bartók, R Mihaly, O Kiss, L Cseuz, D Dudits (2002): Improvement of wheat abiotic stress resistance via genetic transformation. Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 2002. Acta Biologica Szegediensis Volume 46(3-4):5-7

Pauk J. Hansch R. Scwarz G. Nerlich A. Monostori T. Mészáros A. Jenes B. Kertész Z. Matuz J. Schulze J. Mendel L. R. (1998): Transzgénikus búza (Triticum aestivum L.) előállítása Magyarországon. Növénytermelés, 47:241-251.

Pauk J. Kertész Z. Jenes B. Purnhauser L. Manninen O. Pulli S. Dudits D. (1994): Fertile wheat (Triticum aestivum L.) regenerants from protoplasts of embryogenic suspension culture. Plant Cell Tissue Organ Culture, 38:1-10.

Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi- Shinozaki K, Hoisington D (2004): Stress-induced expression in wheat of the Arabidopsis thaliana DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. Genome 47:493-500

Peng YH, Lin WL, Cai WM, Arora R (2007): Overexpression of a Panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. Planta 226:729-740

Perruc E, Charpenteau M, Ramirez BC, Jauneau A, Galaud JP, Ranjeva R, Ranty B (2004): A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in Arabidopsis thaliana seedlings. Plant Journal 38:410-420

Petolino J. F. Hopkins N. L. Kosegi B. D. Skokut M. (2000): Whisker-mediated transformation of embryogenic callus of maize. Plant Cell Rep., 19:781-786.

Purnhauser L.(2006): Molekuláris markerek a rezisztenciagének követéséhez In: Dudits D: A búza nemesbítésének tudománya 287-299. MTA Szegedi Biológiai Központ-Winter Fair, 2006.

Price AH, Atherton NM, Hendry GAF (1989): Plants under drought-stress generate activated oxigen Free Radical Research Comunications 8: 61

Qian G, Han ZX, Zhao T, Deng GB, Pan ZF, Yu MQ (2007): Genotypic variability in sequence and expression of HVA1 gene in Tibetan hulless barley, Hordeum vulgare ssp vulgare, associated with resistance to water deficit. Australian Journal of Agricultural Research 58:425-431

Qureshi J.A., Basri Z., Burton R.A., Singh R.R., Kollmorgen J.E., Fincher G., (1996): Production of fertile transgenic wheat using two different gene expression vectors. Cereals ’96. North Melbourne, Australia: Royal Australian Chemical Instiute, pp. 422-424.

Radchuk R, Radchuk V, Weschke W, Borisjuk L, Weber H (2006): Repressing the expression of the Sucrose nonfermenting-1-related protein kinase gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. Plant Physiology 140:263-278

Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA (2005): Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. Plant Cell and Environment 28:709-718

Richard J. P. (1993): Mechanisms of the formation of methylglioxal from triosphosphates. Biochem Soc Trans 21: 549-553

Riera M, Valon C, Fenzi F, Giraudat J, Leung J (2005): The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and

abscisic acidindependent signalling components. Physiologia Plantarum 123:111-119

Roncarati R, Salamini F, Bartels D (1995): An aldose reductase homologous gene from barley – regulation and function Plant Journal 7: 809

Rooke L, Steele SH, Barcelo P, Shewry PR, Lazzeri PA (2003): Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat Euphytica 129: 301-309

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006): Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. Plant Cell 18:1292-1309

Sanford J. C. (1988): The biolistic process – a new concept in gene transfer and biological delivery. Trends Biotechnology, 6:229-302.

Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H (2004): A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. Plant J 37:645–653

Scholthof K B G, Scholthof H B, Jackson A O (1993): Control of plant-virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants Plant Physiology 102: 7-12

Schweizer P, Pokorny J, Abderhalden O, Dudler R (1999): A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat Molecular Plant-Microbe Interactions 12**:** 647-654

Serik O, Ainur I, Murat K, Tetsuo M, Masaki I. (1996): Silicon cardibe fiber-mediated DNA delivery into cells of wheat (*Triticm aestivum* L.) mature embryos. Plant Cell Rep. 16:133-136.

Setter TL, Flannigan BA (2001): Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm Journal of Experimental Botany 52: 1401-1408

Shaner N, Steinbach P, Tsien R. (2005): "A guide to choosing fluorescent proteins" Nature Methods 2 (12): 905–9.

Shen QH, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ulker B, Somssich IE, Schulze-Lefert P (2007): Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. Science 315:1098-1103

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007): Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany 58:221- 227

Silva JM, Mizuno H, Brady A, Lucito R, Hannon GJ (2004): RNA interference microarrays: High-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells PNAS 101**:** 6548-6552

Singh KB, Foley RC, Onate-Sancez L (2002): Transcription factors in plant defense and stress responses Current Opinion in Plant Biology 5:430–436

Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho TD, Qu R (2000): Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. Plant Sci 155:1–9

Sodkiewicz W, Strzembicka (2004): Application of Triticum monococcum for the improvement of triticale resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*). Plant Breeding 123 (1): 39-42

Srivastava S, Chandra A, Bhatnagar A, Srivastava SK, Ansari NH (1995): Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase Biochemical and Biophysical Research Communications 217: 741

Suprunova T, Krugman T, Fahima T, Chen G, Shams I, Korol A, Nevo E (2004): Differential expression of dehydrin genes in wild barley, Hordeum spontaneum, associated with resistance to water deficit. Plant Cell and Environment 27:1297-1308

Talame V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R (2007): Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. Journal of Experimental Botany 58:229-240

Tamás L. Tamás C. Morell K. M. Appels R. (1999): The use of GFP gene as a reporter gene in wheat transformation. 4th Congress og Hungarian of the Hungarian Genetical Society, p. 166.

Tan I, Wee CC, Sopade PA, Halley PJ (2004): Investigation of the starch gelatinisation phenomena in water-glycerol systems: application of modulated temperature differential scanning calorimetry Carbohydrate Polymers 58: 191-204

Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1992): Expression of a bacterial mtlD gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. Proc Natl Acad Sci **USA 89:2600–2604**

Tarczynski MC, Jensen RG, Bohnert HJ (1993): Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. Science 259:508–510

Terras FRG, Eggermont K, Kovaleva V,: (1995): Small Cysteine-rich antifungal proteins from radish – their role in host defense Plant cell 7:573-588

Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA (2001): Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. Plant Physiol 127:1836–1844

Teulat B, Zoumarou-Wallis N, Rotter B, Ben Salem M, Bahri H, This D (2003): QTL for relative water content in field-grown barley and their

stability across Mediterranean environments. Theoretical and Applied Genetics 108:181-188

The Nobel Prize in Chemistry 2008 "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP" http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/

Tingay S. – McElroy D. – Kalla R. – Fieg S. – Wang M. – Thornton S. – Brettel R. (1997): Agrobacterium tumefaciens-mediated barley transformation. Plant J., 11:1368-1376.

Tondelli A, Francia E, Barabaschi D, Aprile A, Skinner JS, Stockinger EJ, Stanca AM, Pecchioni N (2006): Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance 1 in barley. Theoretical and Applied Genetics 112:445-454

Trujillo M, Altschmied L, Schweizer P, Kogel KH, Huckelhoven R (2006): Respiratory Burst Oxidase Homologue A of barley contributes to penetration by the powdery mildew fungus Blumeria graminis f. sp hordei. Journal of Experimental Botany 57:3781-3791

Tsien R (1998): "The green fluorescent protein" Annu Rev Biochem 67: 509–44.

Vanderjagt DL, Robinson B, Taylor KK, Hunsaker LA (1992): Reduiction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases – aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications Journal of Biological Chemistry 267 : 4364

Van der Krol A. R. Mur L. A. Beld M. Mol J. Stuitje A. R. (1990): Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of copies may lead to a supression of gene expression. Plant Cell, 2:291-299.

Varshney, A., Altpeter, F. (2001): Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (Triticum aestivum, L.). Mol. Breed. 8: 295-309

Vass I (1997): Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus 931-949 Handbook of Photosynthesis

Vasil IK (2007): Molecular genetic improvement of cereals: Transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) Plant Cell Rep 26:1133-1154

Vasil V. Brown S. M. Re D. Fromm M. E. Vasil I.K. (1991): Stabily transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. Bio/Technology, 9:743-747.

Vasil V. Castillo A. Fromm M. Vasil I. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Bio/Technology, 10:667-674.

Vasu K, Singh H, Singh S, Chhuneja P, Dhaliwal HS (2001): Microsatellite marker linked to a leaf rust resistance gene from Triticum monococcum L transferred to bread wheat. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 10 (2): 127-132

Veena, Reddy V.S. Sopory S.K. (1999): Glyoxalase I from Brassica juncea: molecular cloning, regulation, and its over expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. Plant J. 17: 385-395

Warringer J, Ericson E, Fernandez L, Nerman O, Blomberg A (2003): High resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:15724-15729

Weckx JEJ, Clijsters HMM (1997): Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of Phaseolus vulgaris Plant Physiology and Biochemistry 35: 405-410

Weeks J. T. Anderson O. D. Blechl A. E. (1993): Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (Triticum aestivum). Planet Physiol, 102:1077-1084.

Wesley V, CA. Helliwell, N A Smith, MB Wang, DT. Rouse, Q Liu, PS. Gooding, Surinder P. Singh1, D Abbott, P A. Stoutjesdijk, S P. Robinson, AP. Gleave, AG. Green,PM. Waterhouse S (2001): Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. The Plant Journal (2001) 27(6), 581±590

Witrzens B., Brettel R.I.S., Murray F.R., McElroy D., Li Z., Dennis E.S., (1998): Comparison of three selectable marker genes for transformation of wheat by microprojectile bombardment. Aust J Plant Physiol., 25: 39-44.

Wright M. Davson J. Dunder E. Suttie J. Reed J. Kramer C. Hang Y. Novitzky R. Wang H. Artim-Moore L. (2001): Efficient biolistic transifrmation of maize (Zea mays L.) and wheat (Triticum aestivum L.) using the phosphomannose isomerase gene, pmi, as selectable marker. Plant Cell Rep., 20:429-436.

Wu Y, Chen Q, Chen M, Chen J, Wang X (2005): Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (Lolium perenne L.) obtained by Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the vacuolar Na+/H+ antiporter gene. Plant Sci 169:65–73

Xu DP, Duan XL, Wang BY, Hong BM, Ho THD, Wu R (1996): Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiology 110:249-257

Xu P, Zhang Y, Kang L, Roossinck MJ, Mysore KS (2006): Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. Plant Physiol 142:429-440

Xu X. Li B. (1994): Fertile transgenic Indica rice plants obtanied by electroporation of seed embryo cells. Plant Cell Rep., 13:237-242.

Xue GP, Loveridge CW (2004): HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2

transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. Plant Journal 37:326-339

Xue Z, Zhi D, Xue G, Zhang H, Zhao Y, Xia G (2004): Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (Triticum aestivum L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na+. Plant Sci 167:849–859

Yamaguchi T, Blumwald E (2005): Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends Plant Sci 10:615–620

Yamauchi D, Zentella R, Ho TH (2002): Molecular analysis of the barley (Hordeum vulgare L.) gene encoding the protein kinase PKABA1 capable of suppressing gibberellin action in aleurone layers. Planta 215:319-326

Yang JD, Zhao HL, Zhang TH (2004): Heat and drought tolerance of two willow species, Salix gordejevii and Salix babylonica: A comparative study Israel Journao of Plant Sciences 52: 301-306

Yao Q, Cong L, Chang J L, Li K X, Yang G X He G Y (2006): Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment Journal of Experimental Botany, 57:14, 3737–3746

Yao Q, Cong L, He GY, Chang JL, Li KX, Yang GX (2007): Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency Molecular Biology Reports 34: 61-67

Yoshida M, Lin D, Kawakami A (2004): A mini exon in the sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase gene of wheat Journal of Plant Physiology 161: 1277-1279

Zhang L, French R, Langenberg WG, Mitra A (2001): Accumulation of barley stripe mosaic virus is significantly reduced in wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. Transgenic Res 10:13–19

Zhao T, Palotta M, Langridge P, Prasad M, Graner A, Schulze-Lefert P, Koprek T (2006): Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in barley. Plant Journal 47:811-826

Zhou J. - Wu H. - Collet G. F. (1992): Histological study of initiation and development in vitro of adventitious roots in minicuttings of apple rootstock of M 26 and Emla 9. Physiologia Plantarum, 84. 433-440.

Zimmermann G, Baumlein H, Mock HP, Himmelbach A, Schweizer P (2006): The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. Plant Physiology 142:181-192

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Heszky László akadémikus úrnak – SZIE, Genetika és Biotechnológiai Intézet igazgatójának - és Munkatársainak, a sok éves oktatási tevékenységért, mellyel támogatták korábbi diploma dolgozatom és doktori értekezésem elkészülését.

Köszönettel tartozom Dr. Pauk Jánosnak – GK Kft. tudományos tanácsadónak – témavezetéséért, a munkafeltételek biztosításáért és hasznos tanácsaiért. Köszönöm Dr. Matuz János igazgató úrnak és a GK Kft. többi dolgozójának tanulmányaim szakmai és erkölcsi támogatását. Külön köszönet közvetlen munkatársaimnak – Kótai Éva, Majer Petra, Fehérné Juhász Erzsébet, Olasz Mária, Lantos Csaba és Áy Zoltán - segítőkész és lelkiismeretes munkájukért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Patrick Schweizernek szakmai irányításáért és hasznos tanácsaiért. Köszönet illeti Stephan Marzint, Dr. Dimitar Duchkowot, akikkel együtt dolgozhattam. Köszönöm az egyéves németországi kutatási lehetőséget, amelyre a német-magyar pályázat során kerülhetett sor.

Köszönöm Prof. Dudits Dénes, akadémikus főigazgató úrnak a kutatási részvételt az általa vezetett két konzorciumban (NKFP_4/023/2001; KPI_4/064/2004) és a német-magyar pályázatban (NAP_BIO_06-NEWSEEDS). Eredményeink ehhez a három szerződéses kutatáshoz kapcsolódnak. Köszönet illeti Dr. Várallyay Évát, Dr. Dallmann Gézát, és Dr. Horváth V. Gábort, akik a búza transzformációs vektorok elkészítésével járultak hozzá munkánk sikeréhez.

Köszönet a családom minden tagjának, akik mindenben támogattak és mellettem álltak.