SZENT ISTVÁN EGYETEM

GÉNVADÁSZAT, STABIL GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓ ÁRPÁBAN ÉS BÚZÁBAN

Doktori értekezés tézisei

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

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI ÉS A KITŰZÖTT CÉLOK

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.

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 nagy, vagy legalább közepes teljesítményű, adatot szolgáltat a vizsgált gének ozmotikus stressztűrésben betöltött szerepéről. A tesztrendszerrel vizsgálni kívántuk, hogy az érintett géneknek van-e élettani funkciója a beállított stresszhatást tekintve. A gén túltermelése vagy kikapcsolása, a kiváltott stresszhatás esetén előnyt vagy hátrányt jelent a növénynek? 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, az ozmotikus illetve kiszáradás stressz esetén működő gének felderítésére használható.

A genetikai kutatásban a transzformáció a növényi funkcionális genomikai kutatás egyik kulcsmódszerévé vált, ami módszertanilag izolált gének beépítését és transzgénikus növények előállítását jelenti. 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 genomba történő beépítésével és a megváltoztatott tulajdonságok jellemzésével. Ahhoz, hogy a kívánt géneket stabilan kifejeztessük, illetve elhallgattassuk, hatékony transzformációs módszerre van szükség.

Az emberiség egyik legfontosabb élelmiszernövénye a biotechnológiai és szövettenyésztési szempontból viszonylag nehezen kezelhető közönséges búza (*Triticum aestivum* L.). A táplálkozásban és a gazdasági életben betöltött fontos szerepe miatt került középpontba és lett 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. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer kialakítása

2.1.1. Növénynevelés

Három különböző árpa fajtát (Golden Promise, Steptoe, és Morex) vizsgáltunk vízmegvonási stressz hatása alatt. A növényeket normál cserepekbe, kerti talajba ültettük és klímakamrában neveltük egy hétig, minden kísérlethez azonos felnevelési körülményeket biztosítottunk. 16 óra megvilágítást (120 µmol m^2 s-1 a növények szintjén), 8 óra sötét megvilágítási időt, 55% (nappal) és 70% (éjjel) relatív páratartalmat valamint 20°C állandó hőmérsékletet alkalmaztunk.

2.1.2. RNAi konstrukciók előállítása

A célgének szekvenciáit cDNS klónokból PCR technikával, univerzális forward primer és specifikus reverz primerekkel amplifikáltuk. A specifikus primereket a Lasergene (DNASTAR, Madison, USA) számítógépes szoftverrel terveztük meg. A kapott PCR fragmenteket MinElute 96

UF PCR plate-ekkel tisztítottuk (Qiagen, Hilden, Germany), majd a pIPKTA38 vektor (Douchkov és mtsai. 2005) SwaI hasítóhelyére ligáltuk. 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.

A pIPKTA38 vektor PCR fragmentjeit a pIPKTA30N fogadó RNAi vektorba rekombináltattuk inverted repeat-ként a Gateway LR clonase felhasználásával (Invitrogen).

2.1.3. 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 következők voltak: pGFP (Schweizer et al. 1999) a normalizáláshoz, a pUbi-DsRed-nos az RNAi hatások értékeléséhez (Panstruga et al. 2003), és a pIPKTA30_Target vektor (RNAi vektor) (Douchkov és mtsai. 2005).

Kísérleteinkhez a BioRad PDS 1000/He részecskebelövő berendezést használtuk 900 psi Hélium nyomás mellett. 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). Kiegészítő megvilágításként Philips TLD 36W fényforrást alkalmaztunk. 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 viszonyítva (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 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.

2.1.4. A TIGS hatás statisztikai elemzése

A TIGS hatás statisztikai elemzését a GraphPad InStat 3 számítógépes szoftver segítségével hajtottuk végre. Először a vízmegvonással 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 dehidratált levelek DsRed-fluoreszkáló sejt számának arányát 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.

2.2. Stabil genetikai transzformáció búzában

2.2.1. Növényi anyag

Növényi anyagnak a hazai szelekciójú, mexikói származású 'CY-45' tavaszi búza (*Triticum aestivum*. L) genotípust használtunk (Felföldi és Purnhauser, 1992). Szomatikus szövettenyésztési kísérletekben 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.

2.2.2. Alkalmazott plazmid vektorok

Búza növényeinkben az *MLO* gén elhallgattatására a pSTARLING-A konstrukciót használtuk, melybe szensz és antiszensz orientációban építette be kooperációs partnerünk (Dr. Várallyay Éva MBK, Gödöllő) a búza genomjában elhallgattatni kívánt génre tervezett szekvenciákat. A géncsendesítésért felelős plazmidunkat együtt transzformáltuk a *bar* gént hordozó, pAHC20 (Christensen mtsai. 1992) plazmid molekulával.

A lucernából (*Medicago sativa* L.) származó aldóz-reduktáz (*MsALR*) gént az SzBK Növénybiológia Intézetében (Mai Antal és Fahriye Ertugrul) izolálták. Az MsALR gént pAHC25 plazmid molekulába építették be, a *GUS* gén helyére.

Az NBS-LRR típusú rezisztencia analóg gének transzformációjához a pBAJEN (Ahlandsberg és mtsai. 2001) plazmidot használtuk fogadó vektorként (Dr. Dallmann Géza MBK, Gödöllő). A génizolálás után összesen hét különböző NBS-LRR típusú klónt adott át - funkcionális tesztre - együttműködő partnerünk.

2.2.3. A búza genetikai transzformáció lépései

Transzformáció előtt 4-6 órával az egyhetes búza kalluszokat magas mannitol tartalmú, ozmotikus, D_2m táptalajra raktuk át. A részecskebelövést BioRad® PDS1000/He génpuskával végeztük, a gyártó cég által, a használati utasításban megadott iránymutatás szerint.

A néhánynapos inokulumokat egy nappal (20-24 óra) a transzformáció után D_2MCu kalluszindukciós táptalajra helyeztük. A tenyészeteket ezen a táptalajon tartottuk 10-14 napig, 24-25 °C-os sötét termosztátban. Ezt követően a kalluszok normál méretű Petri-csészékben lévő, hormonmentes D_0Cu 5ppt regenerációs táptalajra kerültek, ahol két hétig voltak mesterséges megvilágítás mellett 24-25 °C-os tenyésztőszobában. Két hét után újra regeneráló táptalajra kerültek 10 mg/l-re emelt glufosinate-ammoniummal kiegészített D_0 táptalajra, a nevelést tenyésztőszobában végeztük.

Végül a regenerált növénykéket (2 cm méret fölött) 1/2 MS gyökereztető táptalajra helyeztük, 2% szacharózzal és 20 mg/l glufosinate-ammoniummal kiegészítve és a növényeket tenyésztőszobában neveltük kiültetésig.

A megfelelően meggyökeresedett növényeket közönséges talajba ültettük ki, zárt rendszerű üvegházi körülmények közé. 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. A genetikai transzformációs kísérletek során a célgének és a szelekciós markergén jelenlétének DNS szintű bizonyításához az adott génre specifikus PCR reakciókat hajtottunk végre.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Tranziens génexpressziós tesztrendszer kidolgozása egyedi génfunkció vizsgálatára

Kísérleteinkben felhasználtuk a vörösen fluoreszkáló DsRed fehérje biokémiai tulajdonságait, hogy megismerjük és jelezzük a szárazság stressz tényét, súlyosságát, a transzformált árpa epidermisz sejtekben. Egyedi sejtek vizsgálatára alkalmasnak találtuk az egy hetes növényekről leválasztott első levélen történő tesztelést. Kísérleti rendszerünk 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_Target az árpa jelölt gének RNAi csendesítésére használtuk. Az RNAi konstrukció helyett túltermeltető konstrukciók is használhatók.

A transzformáció 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 dehidratációs stresszkezelés végeztével számláltuk meg a DsRed fluoreszkáló sejteket, majd normalizáltuk az ugyanazon leveleken a stresszkezelés előtt számolt GFP fluoreszkáló sejtek számával.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a TIGS rendszer használhatóságát vízmegvonással stresszelt levelekben, irodalmi adatok alapján összeállítottunk egy listát a stresszválaszban feltételezhetően részt vevő génekről. A lista 14 olyan gént is tartalmaz, melyek expressziós adatok vagy mutáns illetve transzgénikus növényekre vonatkozó adatok alapján szerepet játszhatnak a szárazságtoleranciában. Ezen kívül a listán szerepel - negatív kontrollként - két olyan gén is, melyek feltételezhetően nem játszanak szerepet az abiotikus stressz toleranciában.

A dehidratációs stressz az üres RNAi vektor jelenlétében az esetek többségében csökkentette a fluoreszcens DsRed sejtek számát. Négy RNAi teszt konstrukció a sejtekben statisztikailag szignifikáns módon tovább csökkentette a DsRed expresszáló sejtek számát az üres RNAi vektorral való direkt összehasonlításban. Ez a négy RNAi teszt konstrukció a HvDRF1, HvDHn6, HvNX1 és HVA1 génekre volt célozva. Annak érdekében, hogy teszteljük a kezdeti eredmények ismételhetőségét, beállítottunk egy második, öt ismétlésből álló sorozatot, amelyet ugyanazzal korábban már említett négy RNAi konstrukcióval hajtottunk végre. Mindkét esetben az RNAi konstrukciók a DsRed szignifikáns csökkenését eredményezték a dehidratált levelekben.

A dolgozatban bemutatott adatok azt mutatták, hogy a TIGS rendszer használható eszköz a gének árpa epidermisz sejtek kiszáradás stresszben betöltött szerepének felderítésében.

3.2. A búza stabil genetikai transzformáció eredményei

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.

A 66 növényből molekuláris teszt után 25 esetben kaptunk *bar* génre nézve pozitív eredményt, a *szensz* és *antiszensz* orientációjú inszertekre nézve szintén 25 minta bizonyult pozitívnak. Kiindulási anyagunk 3650 embrió volt.

A *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz génnel végzett transzformációs kísérleteinkben sikerrel vittük át búzába mind a célgént, mind a szelekciós markergént. Az öt kísérletben összesen 4025 db éretlen embrió eredetű kalluszt transzformáltunk. 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 PCR reakcióval végzett teszteléssel. 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.

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 búzafajtába, valamint két különböző, rizs (*Oryza sativa*) eredetű NBS-LRR génanalógot 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. Az antiszensz orientációban bejuttatott génekkel történő transzformáció 0,89 % és 0,44 %-os hatékonyságú volt. Az rizs eredetű rezisztenciagének bejuttatásának hatékonysága 1,47 és 0,62 %-os volt.

4. MEGVITATÁS (KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK)

4.1. 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 már rendelkezésre álló két TIGS szűrő eszköz lehetővé teszi több száztól akár néhány ezer gén tesztelését a dehidratáció toleranciában vagy a kórokozóval szemben betöltött lehetséges szerepének tisztázására. Fontos, hogy az adott cél közvetlenül elérhető a kutatott növényfaj adott genotípusán 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, Devi és mtsai. 2006).

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

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). Egy fő havonta 80-100 gén tesztelését végezheti el, 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 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).

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

A dehidratációs stressz-toleranciára szolgáló TIGS rendszer génfunkciók felderítésében hatékony eszköz lehet az aszállyal összefüggő kérdések genetikai hátterének kutatásában. Ezzel a rendszerrel nem tesztelhetők az elkerüléssel kapcsolatos jellemzők, 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 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.

Korlátozott számú, korábbi ismeretek alapján jól jellemzett jelölt gén felhasználásával bizonyítottuk koncepciónk helyességét a TIGS rendszer működőképességére dehidratációs stresszelt árpában. A TIGS rendszer áteresztőképessége lehetővé teszi, hogy olyan jelölt gének sorát teszteljük, melyeket vízhiány vagy aszály sújtott árpában upreguláltként publikáltak. A DsRed alapú TIGS rendszert a jövőben érdemes lehet még kiterjeszteni árpa hidegtűrés tesztelésére is. Az árpa nemcsak gazdaságilag jelentős, hanem modell növény is a gabonafélék között. Búzával összehasonlítva kiemelt fontosságú, hogy diploid fajról van szó. Ez sok kísérletes előnyt jelent a bonyolultabb genom-szerkezetű búza genetikai kutatásához viszonyítva.

4.2. Genetikai alapanyagok létrehozása stabil genetikai transzformációval funkcionális genomikai kísérletekhez.

A genetikai transzformációval létrehozott összesen 78 transzgénikus vonal megfelelő, független egyedszám, átfogó funkcionális vizsgálatok elvégzéséhez.

Az Mlo gén elhallgattatására irányuló genetikai transzformációs kísérleteinkben a szelektálható markergént és a géncsendesítési konstrukciót együtt transzformáltuk a búza genomjába. Az egyszikű transzformációkban a leghatékonyabb szelekciót lehetővé tevő antibiotikum rezisztencia gének nem engedélyezettek, ha az alapkutatáson túl gyakorlati felhasználás kérdései is szóba jönnek. Jogos igény tehát a markergén-mentes transzgénikus növényi alapanyagok előállítása. Kísérleteinkben a célgént és a szelekciós markergént két külön plazmidon juttattuk be a recipiens genomba.

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 kiültetett növények közül az elpusztult (1,09 %) illetve életben (1,8 %) maradt növények arányát tekintve megállapíthattuk, hogy kapott eredményeink nemzetközi szinten publikált 0,1-2,0 %-os búza transzformációs eredmények fényében is jónak mondhatóak (Varshney és Altpeter 2001).

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. Ez az eredményünk irodalmi adatok tükrében reális eredményként értékelhető (Yao és mtsai. 2006). A továbbiakban a külön plazmid molekulán bevitt szekvenciák együtt öröklődését az utódgenerációk elemzése után értékelhetjük. A transzformációs kísérletekben 0,25 és 1,1 % hatékonyságot értünk 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 és hasonlítható össze. Azokon a növényeken, melyek az üvegházban végzett eddigi kísérletek alapján transzgénikusnak bizonyultak, további molekuláris vizsgálatokat végzünk, a specifikus siRNS-ek jelenlétét és mennyiségét hibridizációs próbával jellemezzük.

Jövőbeni munkánk megvizsgálni, hogy a génmódosítás az utódgenerációkban okoz-e mérhető kórtani változásokat a kontroll növényekhez hasonlítva.

Az izolált és vektorba épített MsALR gén transzgénikus dohány növényekben fokozott kiszáradás toleranciát okozott. (Oberschall és mtsai 2000). Korábbi 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 19 új, bizonyítottan transzformáns búza vonal tesztelését folytatjuk génexpressziós szintű vizsgálatokkal, majd a gént fokozottan kifejező vonalainkat komplex stresszdiagnosztikai rendszerben kezdjük el vizsgálni (Majer és mtsai. 2008).

A nemzetközi szakirodalomban eddig viszonylag kevés publikáció látott napvilágot izolált rezisztenciagének búzába történő bevitelével kapcsolatban. Kísérleteinkben mindegyik génanalóg transzformációja bizonyítottan transzformáns növények kiültetéséhez vezetett. A különböző kísérletekben a bejuttatási hatékonyság 0,44 és 1,71% között volt.

Általánosságban elmondható, hogy az ősi búza fajok, potenciális rezisztencia gén donorok lehetnek, amint ezeket a hagyományos nemesítés is használta már. A rokon fajokban rejlő lehetőségeket érdemes kihasználni. Különösen annak tudatában, hogy a rezisztencia gének közös, egymáshoz nagyon hasonló domain felépítésűek, un. NBS-LRR /nucleotid binding site leucin rich repeat/ struktúrát mutatnak. Ennek következtében a fajok közötti célzott génátvitel, a hagyományos módszerekhez hasonló, de hatékonyabb alapanyag előállítási módszer lehet.

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 sem elhanyagolható szempont, hogy a rokon fajok közötti célzott génátvitel, gyakorlati szempontból lényegesen kevesebb ellenzést válhat ki, a technológia alkalmazását ellenzőkből.

ÚJ ÉS ÚJSZERŰ 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.

8. IRODALOMJEGYZÉK

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

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

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

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

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.

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

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

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

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.

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

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.

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

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

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.

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

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.

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

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

MIHÁLY RÓBERT TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉGE

Tudományos impakt faktoros angol nyelvű cikkek:

Marzin S, Mihaly R, Pauk J, Schweizer P. (2008): A transient assay system for the assessment of cellautonomous gene function in dehydration stressed barley, Journal of Experimental Botany, vol 59: 3359-3369 **(az első két szerző egyaránt első szerzőnek van bejegyezve)**

Monostori T., Cs. Lantos, R. Mihály and J. Pauk (2003): Induction of embryogenesis without exougenous hormone-supplement in barley microspore culture. Cereal Research Communications 31: 297-300.

Hasan, M., Pauk, J., Jankulosky, L., Mihály, R., Tóth-Lőkös K., Falusi, J., Petróczi, I., Kertész, Z. (2001): Comparison of in vitro androgenic response and F1 seed production in wheat (Triticum aestivum L.). Cer. Res. Comm., 29: 297-304.

Tudományos lektorált angol nyelvű cikk:

Kertész Z., Hassan S., Bánhidy J., Kertész Cs., Mihály R., Pauk J. (2002): Evaluation of anther culrture-derived wheat lines in wheat breeding and seed production. Hungarian Agricultural Research, 10 (4): 4-6.

Tudományos lektorált magyar nyelvű cikk:

Lantos Csaba, Gémesné Juhász Anikó, Somogyi György, Mihály Róbert, Somogyi Norbert és Pauk János (2008): *In vitro* androgenezis indukciója fűszerpaprika (*Capsicum annuum* L.) mikrospóra tenyészetben. Agrár és Vidékfejlesztési Szemle 3.(2): 169-174

Mihály Róbert; Konkoly Marianna; Monostori Tamás, Pauk János (2008) Funkcionális genomikai vizsgálatok megalapozása: Markergén bejuttatása búzába (Triticum aestivum L.) Agrár és Vidékfejlesztési Szemle 3.(2):156-162.

Mihály R., Pauk J. (2007): Transzformált idegen gén (bar) szelekciója búza (Triticum aestivum L.) portok tenyészetben. Növénytermelés, 56 (1-2.): 13-25.

Írásban megjelent előadás összefoglalók angolul:

Róbert Mihály, C. Lantos, Z. Kertész, Á. Mesterházy and J. Pauk (2006): Using of doubled haploids in wheat breeding. The International Conference „Haploids in Higher Plants III”12-15 february 2006. Vienna-Austria p. 34.

Pauk J., P. Acs, R. Mihály, C. Lantos, Z. Kertész and J. Matuz (2004): Technological and nutrition quality of transgenic wheat lines. International Wheat Quality Conference, From Molecular Improvement to Consumer Needs, May 29-31, Beijing, China, pp. 35-36.

Janos Pauk, Csaba Lantos, Mihály Jancsó and Robert Mihály (2004): Microspore culture of small grain cereals (wheat, triticale, rice) c). Workshop meeting of COST Action 851, lecture, november 11-13, Palermo, Italy, pp. 10-11.

Pauk J., É. Gelencsér, E. Ács, G. Hajós, R. Mihály, A. Nagy, E. Kiss (2003): Agronomical and biological evaluation of wide-range herbicide (ppt) resistant spring wheat (Triticum aestivum L.). Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium, S.I.M.I., Roma, pp. 313-316.

Pauk J., R. Mihály, É. Kótai, O. Kiss, Sz. Petrecz, Á. Mesterházy, Z. Kertész, J. Matuz (2002.): Wheat breeding by in vitro derived haploids. Chinese-Hungarian Workshop on „Molecular genetics and breeding in wheat" Martonvásár/Szeged, May 21-26., pp. 30-32.

R Mihály, E Kótai, O Kiss, J Pauk (2002): In vitro selection of transformed foreign gene (bar) in wheat anther culture Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 2002. Acta Biologica Szegediensis Volume 46(3-4):9-10,

Pauk J., Lantos Cs. and Mihály R. (2002): Cereal (wheat and triticale) microspore culture. Cost Action 851, Working Group 1, lecture, 10-11 May, Book of abstract p. 11.

Pauk J., Fertugrul F., Kótai É., Bartók T., Mihály R., Kiss O., Cseuz L., Györgyey J., Dudits D. (2002): Breeding drought tolerant wheat genotype utilizing alien genes (ALR, Ferritin). Proceedings of EUCARPIA Cereal Section Meeting, Salsomaggiore,

Pauk J., R. Mihály, É. Kótai, T. Bartók, O. Kiss, L. Cseuz, M. Domoki, A. Mai, A. Fehér, J. Györgyey, D. Dudits (2002): Genetic transformation of cereals. Bulgarian-Hungarian Bilateral Seminar, 23-24 September, Szeged, pp 7

Pauk J., R. Mihály, K. Talpas, R. Hansch, R.R. Mendel and Z. Kertész (2001): Wheat genetic transformation and its breeding aspects. In: Z. Bedő and L. Láng (eds): Wheat in a Global Environment. Proceedings of the 6th International Wheat Conference, 5-9 June 2000, Budapest, Hungary, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp.537-540.

Pauk, J., R. Mihály, R. Hänsch, J. Schulze, R.R. Mendel (1998): Sexual transfer of a transgene (bar) into a non-transformed wheat gonotype and cell-level selection of the marker gene in microspore and anther culture (lecture). In Altman-Ziv-Izhar (eds): Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. Kluwer Ac. Publ. Dordrecht/Boston/London, pp. 193-196.

Írásban megjelent előadás összefoglalók magyarul:

Lantos Csaba, Mihály R., Bóna L. és Pauk J. (2005): Embriógenezis indukciója tritikálé mikrospóra tenyészetben. XI. Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, március 3-4. Budapest, MTA 61 o.

Áy Z., Mihály R., Kereszt A., Simonné K.I., Pauk J. (2004): Rizs (*Oryza sativa* L.) genetikai transzformációja a lucernából izolált génnel. XI. Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, március 3-4. Budapest, MTA, p. 29.

Lantos Cs., Mihály R., Kiss E. és Pauk J. (2003): Embriófejlődésre ható tényezők vizsgálata búza (*Triticum aestivum* L.) mikrospóra tenyészetben, IX., Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, MTA, Budapest, 25. o.

Fehérné J.E., Kótai É., Mihály R., Pauk J. (2004): Búza (Triticum aestivum L.) agrobacteriumos transzformációja lucerna eredetű aldóz-reduktáz (ALR) génnel. X. Növénynemesítési Tudományos Napok, poszter, február 18-19. Budapest, MTA, p. 87.

Mihály R., Fehérné J.E., Pauk J. (2004): A rizs (Oryza sativa L.) genetikai transzformációja lucerna (Medicago sativa L.) eredetű ferritin génnel. X. Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, február 18-19. Budapest, MTA, p. 22.

Pauk J., Mihály R., Fehérné J.E., Kótai É. (2004): Genetikai transzformáció növényekben. MTA ÉKB-KÉKI-MÉTE, 315. Tudományos Kollokvium, március 4., 287. füzet. pp. 5.

Mihály Róbert, Áy Zoltán, Pauk János (2003): Az inoculum szerepe a gabonafélék részecskebelövéssel történő genetikai transzformációjában. IX. Növénynemesítési Tudományos Napok 2003.III.5-6. Budapest, MTA, p. 29

Bánhidy J., Kertész Cs., Kótai É., Mihály R., Kertész Z., Pauk J. (2002): Híd a transzgén és a transzgénikus fajta között. VIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, Budapest, p 20.

Mihály R., Petrecz Sz., Kótai É., Kiss O., Mészáros A., Talpas K., Gelencsér É., Kertész Z., Pauk J. (2002): Transzformált Idegen gén sejtszintű szelekciója és a transzgénikus vonal szabadföldi kibocsátása. VIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, Budapest, p. 18.

Pauk J., Mihály R., Kótai É., Kiss O., Petrecz Sz., Bánhidy J. Csősz M., Beke B., Mesterházy Á., Kertész Z., Matuz J. (2002): Nemesítés és androgenezis: álom és délibáb, biotechnológiai kutatás növénynemesítési céllal (Erdei Péter emlékének ajánlva). VIII. Növénynemesítési Tudományos Napok, előadás, Budapest, p. 17.

Poszterek magyarul:

Lantos Cs., Mihály R., Gémesné Juhász A., Táborosiné Ábrahám Zs., Somogyi N., Somogyi Gy., Pauk J. (2007): Fűszer- és étkezési paprika mikrospórák izolálása és tenyésztése. XIII. Növénynemesítési Napok, március 12., Budapest, MTA 110. o.

Könyvrészlet angol nyelven:

Pauk J., Hassan M.S., Puolimatka M., Lantos Cs., Mihály R., Mesterházy Á., Kertész Z., and Matuz J. (2003): Microspore- and anther culture improvements for wheat breeding. In Mujib, A., M.J. Cho, S. Predieri, S. Banerjee (eds): In Vitro Application in Crop Improvement: Recent Progress. Science Publishers Inc., USA, Enfield, New Hampshire, pp. 131-151.

Pauk J., Mihály R., Puolimatka M. (2003): Protocol for wheat (Triticum aestivum L.) anther culture. In Kasha K. and Maluszynski M. (eds): Doubled Haploid Production in Crop Plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, pp. 59-64.

Pauk J., Mihály R., Monostori T., Puolimatka M. (2003): Protocol of triticale (XTriticosecale Wittmack) microspore culture. In: K. Kasha and M. Maluszynski (eds): Doubled Haploid Production in Crop Plants. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London, pp. 129-134.

Pauk J., R. Mihály, A Mészáros, G. Schwarz, R. Hänsch (2000): Transformation of foreign gene and sexual transfer of transgene in wheat. In: G. Hrazdina (ed): Use of Agricaulturally important genes in biotechnology. IOS Press, Amsterdam-Berlin-Oxford-Tokyo-Washington, pp. 112-116.

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.