SZENT ISTVÁN EGYETEM

A *Craterostigma plantagineum* Hochst. és a *Ramonda myconi* Reichb., mint a kiszáradástűrés tanulmányozásában fontos modellnövények, szövettenyésztése és genetikai transzformációja

Doktori (PhD) értekezés

Tóth Sándor

Gödöllő

2009

Doktori iskola:	Növénytudományi Doktori Iskola
Vezetője:	Dr. Heszky László, az MTA rendes tagja igazgató, egyetemi tanár SZIE Genetika és Biotechnológiai Intézet
Tudományága:	Növénynemesítés és kertészeti tudományok
Témavezető:	Dr. Toldi Ottó tudományos munkatárs, PhD Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Dr. Heszky László doktori iskola vezető	Dr. Toldi Ottó témavezető

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 5

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS 7

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 9

2.1. KISZÁRADÁSTŰRÉS 9
2.1.1. Történeti áttekintés 9
2.1.2. A vegetatív kiszáradástűrés evolúciója 10
2.1.3. A kiszáradástűrő növények ökológiája 12
2.1.4. A kiszáradástűrő edényes növények taxonómiai osztályozása 14
2.1.5. A kiszáradástűrés mechanizmusa 16
2.1.5.1. Sérülések a kiszáradás és az újranedvesedés alatt 20
2.1.5.2. A védekezés és javítás mechanizmusai 21
2.1.6. A kiszáradástűrés kutatásában alkalmazott megközelítések 29
2.1.6.1. Mezőgazdaságilag fontos növények 30
2.1.6.2. Kiszáradástűrő rendszerek 31
2.1.6.3. Genetikai modellrendszerek 32
2.1.7. A kiszáradástűrő növények in vitro technikái 35
2.2. AZ AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-RE ALAPOZOTT GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓS MÓDSZER 39
2.2.1. Az Agrobacterium törzsek, mint növényi kórokozók 39
2.2.2. Génátvitel az Agrobacterium-ból a gazdanövénybe 40
2.2.3. Az Agrobacterium fajok felhasználása növénygenetikai transzformációs vektorként 43

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 46

3.1. FELSZÍNSTERILIZÁLÁS 46
3.1.1. A Craterostigma plantagineum előkészítése in vitro kultúrához 46
3.1.2. A Ramonda myconi előkészítése in vitro kultúrához 46
3.2. NÖVÉNYANYAG 47
3.2.1. A Craterostigma plantagineum mikroszaporítása 47
3.2.2. A Ramonda myconi mikroszaporítása 47
3.3. NÖVÉNYREGENERÁCIÓS MÓDSZEREK KIFEJLESZTÉSE 48
3.3.1. Craterostigma plantagineum növények kalluszosítása és regenerációja 48
3.3.2. Ramonda myconi növények kalluszosítása és regenerációja 49
3.4. AGROBACTERIUM TÖRZS 49
3.5. GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓ 50
3.5.1. Az Agrobacterium előkészítése és együttenyésztése 50
3.5.2. A Craterostigma plantagineum genetikai transzformációja 51
3.5.3. A Ramonda myconi genetikai transzformációja 52
3.6. DNS EXTRAKCIÓ ÉS PCR ANALÍZIS 52
3.7. SOUTHERN ANALÍZIS 53
3.8. A GUS RIPORTERGÉN AKTIVITÁSÁNAK HISZTOKÉMIAI VIZSGÁLATA 54
3.9. STATISZTIKAI ANALÍZIS 54

4. EREDMÉNYEK 56

4.1. A MIKROSZAPORÍTÁS KIDOLGOZÁSA 56
4.1.1. A Craterostigma plantagineum mikroszaporításának kidolgozása 56
4.1.2. A Ramonda myconi mikroszaporításának kidolgozása 57
4.2. NÖVÉNYREGENERÁCIÓS MÓDSZER KIDOLGOZÁSA 59
4.2.1. Kalluszindukció a Craterostigma plantagineum levélszegmenseken 59
4.2.2. Növényregeneráció Craterostigma plantagineum kalluszból 61
4.2.3. Kalluszindukció Ramonda myconi levélszegmenseken 61
4.2.4. Növényregeneráció Ramonda myconi kalluszból 63
4.3. GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓ 66
4.3.1. A Craterostigma plantagineum Agrobacterium tumefaciens vektorra alapozott genetikai transzformációja 66
4.3.1.1. Az *Agrobacterium*-os transzformáció hatékonyságának növelése mechanikai és biokémiai módszerekkel 66
4.3.1.2. Szelekciós táptalajon regenerált növények vizsgálata PCR analízissel és Southern-hibridizációval 69
4.3.1.3. A feltételezhetően transzgénikus kalluszok és növények vizsgálata GUS festéssel 70

4.3.2. A Ramonda myconi Agrobacterium tumefaciens vektorra alapozott transzformációja *71*
4.3.2.1. Az *Agrobacterium tumefaciens* elölésére és a transzgénikus explantumok szelekciójára használt antibiotikumok hatása a növényregenerációra 71
4.3.2.2. Az *Agrobacterium tumefaciens* sejtek penetrációját elősegítő mikrosebzés hatása a transzformáció hatékonyságára 74
4.3.2.3. Kanamycin hatása a regeneráló növények morfogenezisére 75
4.3.2.4. Feltételezhetően transzgénikus növények PCR és Southern-blot vizsgálata 75
4.3.2.5. Szelekciós táptalajon regenerált növények vizsgálata GUS festéssel 77
4.4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 78

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 79

6. ÖSSZEFOGLALÁS 81

7. SUMMARY IN ENGLISH 85

MELLÉKLET 89

IRODALOMJEGYZÉK 89

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2iP	2-isopentenil-adenin
ABA	abscisic acid – abszcizinsav
ADP	adenozin-di-foszfát
ATP	adenozin-tri-foszfát
AS	acetosyringone
*Bam*HI	restrikciós endonukláz
BAP	6-benzylaminopurin
bp	bázis pár
cDNS	copy DNS
CI	kallusz indukáló táptalaj
CMS	*Craterostigma* mikroszaporító táptalaj
CPY	baktériumszaporító táptalaj
eGFP	enhanced green fluorescent protein – erősített zöld fluoreszcens fehérje
éls	érett levél szegmens
fls	fiatal levél szegmens
FP	Furini-féle protokoll
G-418	geneticin - aminoglikozid típusú antibiotikum
GA_3	gibberellin acid – gibberellin sav
GV2260	*Agrobacterium* törzs megnevezése
HAS	hidroxiacetosyringone
*Hin*dIII	restrikciós endonukleáz
HSP	hősokk protein
IAA	indol-3-acetic-acid – indol-3-ecetsav
LEA	leate embriogenezis abundant proteins – késői embriógenezis fehérjék
MES	morfo-etán-szulfon-sav
MS	Murashige-Skoog táptalaj
NAA	naftil acetic acid – naftilecetsav
NR	növényregeneráló táptalaj
nptII	neomicin-foszfotranszferáz II
PCR	polimerase chain reaction
*Pst*I	restrikciós endonukleáz

p35SGUSINT	plazmid
pFF19G	plazmid
RA	*Ramonda* mikroszaporító táptalaj
Ri	hajszálgyökerűséget indukáló plazmid
T-DNS	transzfer DNS
Ti	tumor indukáló plazmid
TIP	tumor inducing principle – tumor indukáló részecske
TP	Toldi-féle protokoll
YEB	baktériumszaporító táptalaj

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A magasabb rendű növények folyamatosan ki vannak téve olyan abiotikus környezeti hatásoknak, melyek befolyásolják fejlődésüket, növekedésüket, meghatározzák produktivitásukat. Akkor, ha ezek az abiotikus környezeti hatások (túl alacsony, illetve túl magas hőmérséklet, hiányos ásványi anyag ellátás, nem megfelelő fényviszonyok, vízhiány) az adott fajra jellemző optimum-értékeken kívül esnek, a növény élettani stresszhelyzetbe kerül. A stressz által kiváltott növényi válaszreakciók hatékonysága alapján megkülönböztethetünk stressz-érzékeny és stressz-toleráns növényeket. A mezőgazdasági növénynemesítés egyik legfontosabb feladata, hogy az agronómiailag jelentős, stressz-érzékeny növényeket fokozatosan stressz-toleránssá alakítsa. A klasszikus növénynemesítés mellett ehhez nyújthat segítséget a növényi biotechnológia módszere. Biotechnológiai módszerekkel a stressztoleranciát kódoló gének azonosíthatók, izolálhatók és megfelelő, növényekben aktív szabályozó DNS szekvenciákkal történő kiegészítés után az izolált gének növényi sejtekbe juttathatók. A sejtmagi DNS-be való beépülés után az idegen gén - promóterétől függően - szövet, fejlődési stádium vagy fiziológiai állapot függően működésbe lép. A biotechnológiai módszerek alkalmazását az is indokolja, hogy az évtizedekig tartó nemesítési idő harmadára/negyedére csökkenthető.

Az abiotikus stresszhatások közül a vízhiány okozta stressz a legalaposabban tanulmányozott élettani folyamat. A legtöbb magasabb rendű növényfaj a 10-15%-os vízhiányt a sejtek ozmoregulációs képességeinek köszönhetően tolerálni képes. Azonban ettől jelentősebb mértékű vízvesztés esetén a növény képtelen fenntartani a sejtfunkciókat és a fotoszintézist. A növényeknek ezt a csoportját homoiohidratúrás fajoknak nevezzük. A növényvilág kisebb része (mohák, zuzmók, harasztok, páfrányok és a zárvatermők egy része, az ún. kiszáradástűrő, vagy újjáéledő növények) azonban egészen szélsőséges vízdeficitet is képesek tolerálni. Jellemző adat, hogy amíg normális vízellátottság mellett ezen növények friss tömegének 70%-a víz, addig a vízmegvonást követően ez az érték 2%-ra csökkenhet. Öntözés után azonban átlagosan 48-72 órán belül helyreáll az eredeti állapot, a növény levelei kiegyenesednek, zöldek lesznek, a fotoszintézis ismét működésbe lép. Ezt a különleges tulajdonságot a poikilohidratúrás *Craterostigma plantagineum*-ban kezdték vizsgálni molekuláris szinten. A *C. plantagineum* napjainkra a növényi szárazságtűrés molekuláris genetikai és biokémiai vizsgálatainak fontos kísérleti modellnövényévé vált. Az utóbbi

években más fajok vizsgálatát is célul tűzték ki a szárazság stressz okozta folyamatok elemzéséhez, többek között a Pireneusok törmeléklejtőin élő *Ramonda myconi*-ét.

A modellnövények tanulmányozásával, vizsgálatával közelebb juthatunk a vízdeficit okozta stressz molekuláris, biokémiai alapjainak megismeréséhez, melyet aztán a mezőgazdaságilag fontos gazdasági növényeink nemesítése során hasznosíthatunk, javítva azok szárazsággal szembeni ellenállóságát. Annak ellenére azonban, hogy már sok gént sikerült izolálni a szárazságstresszel kapcsolatban, a legtöbb adat csak leíró jellegű és csak néhány kódolt fehérje funkciója ismert. A mutánsok előállítására használt antiszensz RNS technika alkalmazása óriási lehetőség lehet, amelynek segítségével ezen gének funkcionális vizsgálata megvalósulhat. Az elméleti megismerés később utat nyithatna a biotechnológiai alkalmazás felé. Ehhez azonban nélkülözhetetlen az adott modellnövény genetikai transzformációs módszerének kidolgozása (az antiszensz RNS technika csak genetikai transzformáción keresztül alkalmazható).

Ezért célul tűztük ki, hogy kifejlesztjük a *C. plantagineum* és a *R. myconi* mikroszaporítási és szövettenyésztési rendszerét, majd ezt alapul véve egy jól működő és hatékony genetikai transzformációs eljárást alakítunk ki.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Kiszáradástűrés

2.1.1. Történeti áttekintés

A kiszáradástűrés vizsgálatának története több mint 300 évvel ezelőtti felfedezésekor kezdődött, óriási viták kereszttüzében, hiszen létezése valamennyi, akkori tudományos elméletnek ellentmondott. Anthony von Leeuwenhoek volt az első, aki tudományos alapossággal vizsgálta a kiszáradástűrés jelenségét, rögtön azután, hogy feltalálta a mikroszkópot. 1702-ben ezt írja egyik barátjának (Schierbeek, 1959):

„ A következő nap reggel 9 óra körül a levegő nagyon forró volt és száraz. Kivettem az ólom ereszcsatornában összegyűlt üledékből egy keveset … majd a kő víztartályból vett esővízzel meglocsoltam … így, ha még volt benne valamiféle élő állat, akkor annak elő kellett bújnia. Meg kell valljam, egyáltalán nem gondoltam, hogy bármiféle élőlény lesz ebben az anyagban, ami ennyire ki volt száradva.

Tévedtem. Szűk 1 óra elteltével, amikor megnéztem, legalább 100 olyan állatkát láttam, mint amilyeneket fentebb leírtam.”

Ezek az állatkák a kerekesférgekhez tartozó *Philodina roseola*-k voltak (Tunnacliffe és Lapinski, 2003). Tehát a kiszáradástűrés jelenségét először nem is a növényeknél írták le, hanem az állatoknál. Az 1800-as évek közepére másik két állatcsoportban is megfigyelték a kiszáradástűrést: a fonálférgeknél és a medveállatkáknál (Keilin, 1959; Alpert, 2000). Az utóbbi csoport azért is érdekes, mert leggyakoribb előfordulási helyük a mohák és zuzmók telepeiben tárolt vízben van. Az 1960-as évek közepére egy rovarlárvánál és néhány póklárvánál is kimutatták a toleranciát (Hinton, 1968; Crowe és mtsai., 1992). Ezzel szemben a gerincesek egyetlen csoportjában sem találtak kiszáradást túlélő fajt.

A növényeknél viszonylag szélesebb körben elterjedt ez a tulajdonság. Toleráns mohákról már 1886-ban beszámoltak, 1914-ben a páfrányok gametofita alakjáról, 1931-ben sporofita alakjáról bizonyították be, hogy kiszáradástűrők, 1921-ben a zárvatermők több fajában leírták a jelenséget (Kappen and Valladares, 1999; Alpert, 2000). Az 1980-as évek végére a legtöbb kiszáradástűrő edényes növényfajt azonosították (Gaff, 1977, 1987; Gaff és Latz, 1978; Gaff és Bole, 1986; Gaff és Sutaryono, 1991). Számuk a Porembski által 2000-ben leírtakkal együtt kb. 330-ra tehető. Az utóbbi 15 évben kezdődött meg ezeknek a fajoknak

a molekuláris biológiai vizsgálata, amelyhez komoly segítséget jelenthet egy jól működő genetikai transzformációs rendszer.

A legmeggyőzőbb bizonyítékot a kiszáradástűrés létezésére Becquerel 1951-es kísérlete szolgáltatta, amikor néhány kiszáradt medveállatkát, kerekesférget, négy növényfaj magját, három gombafaj és két baktériumfaj spóráját, a *Xanthoria parietina* zuzmó darabjait és a *Grimmia* és *Barbula* moha nemezettség tagjait lehűtötte az abszolút 0 C°-tól 0,05 C°-ra, majd ezt követően felmelegítette és rehidratálta őket. Azt tapasztalta, hogy valamennyien túlélték ezt a durva kezelést. Becquerel ezt a tesztet azért hajtotta végre, hogy megválaszolja azt a kérdést, ami a kiszáradástűrés felfedezésekor keletkezett az élet valódi természetével kapcsolatban: Vajon meg lehet állítani az életet, majd utána egyszerűen újraindítható? A mai tudomány álláspontja szerint a kiszáradás folyamán – amikor a sejtek víztartalmuk 80-90 %-át elvesztik – egyes élő szervezetek le tudják lassítani a metabolizmusukat egy olyan pontig, ahol már nem lehet kimutatni eltérést a környezet fizikai, kémiai reakcióihoz képest, majd ezután képesek visszanyerni normális anyagcseréjüket és életfunkcióikat (Keilin, 1959; Hinton, 1968; Clegg, 2001). Azokat az edényes növényeket, amelyek rendelkeznek ezzel a tulajdonsággal, újjáéledő növényeknek (resurrection plant) is szokták nevezni.

A kiszáradástűrés felfedezése tehát arra mutatott rá, hogy az élő dolgok 3 állapotban létezhetnek: nemcsak élőek vagy halottak lehetnek, hanem van egy mozdulatlan, statikus, úgynevezett anabiotikus állapotuk is (Clegg, 2001).

2.1.2. A vegetatív kiszáradástűrés evolúciója

A moháknál széles körben elterjedt kiszáradástűrés alapján valószínűsíthető, hogy a vegetatív kiszáradástűrés az ősi szárazföldi növények alapvető tulajdonsága volt, melynek kezdeti evolúciója meghatározó lépésnek kellett lennie az édesvízi eredetű primitív növények szárazföldi elterjedésében (Mishler és Churchill, 1985). Azonban a döntően extracelluláris vízszállításra épülő kiszáradástűrés kialakulásának az ára az alacsonyabb anyagcsere- és növekedési intenzitás volt. A növényi vízszállítás fokozatos internalizálódásának eredményeként létrejött homoiohidrikus jelleg kifejlődésével egyre inkább lehetővé vált a növényi vízviszonyok külső körülményektől való függetlenedése, ami hatékonyabb anyagcserét, növekedést, egyben a növények felépítésének egyre bonyolultabbá válását és testméretük növekedését eredményezte. Ennek következtében pedig a növények a

törzsfejlődés során fokozatosan elveszítették vegetatív szöveteik kiszáradástűrő képességét (Oliver és mtsai., 2000). A vegetatív kiszáradástűrést biztosító gének azonban részt vettek a különböző szaporítóképletek kiszáradástűrésének a biztosításában is. Számos bizonyíték szól amellett, hogy a magvak kiszáradástűrési mechanizmusa a vegetatív kiszáradástűrés kezdetleges formájából fejlődött ki. Miután az a magvakban kialakult, ezt követően a vegetatív szövetekben is újra kifejlődött a szélsőségesen száraz területeken élő növények között. Az edényes növényekben a kiszáradástűrés re-evolúciója számos alkalommal megtörtént (Oliver és mtsai., 2000). A *Selaginella*-félék családjában (1. ábra) és a harasztoknál is kialakult legalább egy független evolúciós (vagy re-evolúciós) kiszáradástűrési mechanizmus. A zárvatermők között pedig legalább nyolc független re-evolúciós esemény figyelhető meg. Az utóbbi időben elvégzett molekuláris és fiziológiai vizsgálatok azt a hipotézist látszanak alátámasztani, hogy a zárvatermők a vegetatív kiszáradástűrés képességüket a magokból nyerték vissza (Illing, 2005). Az edényes növények között csak egyetlen nagyobb osztály, a törzsfejlődéstanilag különböző csoportokat tartalmazó nyitvatermők tagjainál nem alakult ki ez a tulajdonság.

1. ábra A *Selaginella* család legismertebb tagja a *Selaginella lepidophylla* vagy *jerikói rózsa,* amelyet Hooker már 1837-ben leírt.

A vegetatív kiszáradástűrés evolúciója során a kiszáradástűrő növényekben nem a szabályozott vízháztartás és a kielégítő vízellátás fenntartását biztosító anatómiai és működési adaptációk fejlődtek ki, hanem olyanok, amelyek az időszakos vízhiány elviselésére teszik őket képessé (Tuba, 2002).

2.1.3. A kiszáradástűrő növények ökológiája

A kiszáradástűrés egyrészt nagyon szokatlan és ritka jelenség, másrészt általánosan elterjedt.

A növények reproduktív képleteiben, a pollenben, a spórákban és magokban a kiszáradástűrés teljesen szokványos. Sőt, olyan extrém jól működik, hogy Kínából származó lótusz (*Nelumbo nucifera*) magok több mint 1000 év után is megőrizték életképességüket és sikerült kicsíráztatni őket (Shen-Miller és mtsai., 2002). A kiszáradás szempontjából toleráns magok hagyományosan úgy ismertek mint „orthodox" magok, szemben a kiszáradásra érzékeny magokkal, amelyeket „rekalcitráns" magoknak neveznek. Fontos különbség a magok és a kifejlett növények között az is, hogy a kiszáradástűrés megjelenése a kifejlett növényekben a környezet által indukált, míg a magoknál ez része a fejlődési, érési programnak. A pollen és a spóra esetében a kiszáradástűrés megléte inkább szabály, mint kivétel. A magokhoz hasonlóan része a fejlődési programjuknak. A kiszáradástűrés elterjedtsége a magokban és a spórákban az egyik ok, amiért azt gondoljuk, hogy valamennyi növényben jelen van a kiszáradástűrés genetikai potenciálja (Alpert és Oliver, 2002).

A vegetatív állapotban történő kiszáradás túlélésének képessége a kevésbé összetett felépítésű csoportoktól a rendszertanilag magasabb rendű, virágos növények felé haladva egyre ritkábban fordul elő (Bewley és Krochko 1982; Oliver és Bewley 1997). A zuzmók és a mohák körében még viszonylag általános ez a tulajdonság (Richardson, 1981; Proctor, 1990), a harasztoknál már nem túl gyakran található meg és viszonylag ritka a zárvatermőknél (Porembski és Barthlott, 2000), a nyitvatermőknél pedig egyetlen fajt sem találtak, habár a pollenjük és magjuk kiszáradástűrő lehet (Wilson és mtsai. 1979; Gaff, 1980).

A vegetatív kiszáradástűrő zárvatermő növényeknek földrajzi elterjedtsége igen széleskörű, hiszen az Anktartiszt leszámítva valamennyi kontinensen megtalálhatók, habár eloszlásuk nem egyenletes. A legnagyobb számban és fajgazdagságban Dél-Afrikában, Nyugat-Ausztráliában és Dél-Kelet-Amerikában fordulnak elő (Gaff, 1977, 1987; Gaff és Latz, 1978; Porembski és Bartholt, 2000). Európában a *Gesneriaceae* család néhány faja képviseli az újjáéledő növényeket (Muller és mtsai., 1997; Drazic és mtsai., 1999), míg Észak-Amerikában három fűfélét írtak le (Iturriaga és mtsai., 2000).

Annak ellenére, hogy a kiszáradástűrő növények fajspektruma gazdag és földrajzi elterjedtsége széleskörű, ökológiai szempontból egy viszonylag szűk élettérben növekednek. Azokban az ökológiai niche-ekben telepednek meg – főleg mikroélőhelyek –, ahol folyamatosan vagy időszakosan szárazság van és a kiszáradásérzékeny növények csak

elszórtan vagy már egyáltalán nem tudnak megélni. A leghidegebb és legszárazabb élőhelyeken, ahol a köd és a harmat a legfőbb vízforrás, a kiszáradástűrő mohák, zuzmók, algák és cianobaktériumok képezik a vegetációt (Thomson és Iltis, 1968; Friedman és Galun, 1974; Davey, 1997). A kiszáradástűrő edényes növények leggyakoribb előfordulása a trópusi területek speciális sziklakiemelkedései, az úgynevezett szigethegyek (inselbergek) (2. ábra). A szigethegyek geológiailag ősi, kristályos szárazföldi pajzsokon előforduló tömör, prekambriumi kőzetek (mint a gránit és a gneisz), amelyek az erózióval szemben igen ellenállóak. Porembski és Bartholt (2000) úgy becsüli, hogy az újjáéledő edényes növények 90 %-a ezeken a szigethegyeken él. Néhány faj a kitett sziklafelszíneken nő, míg mások a hasadékokban (Nobel, 1978; Gildner és Larson, 1992). Az afrikai sziklakiemelkedések időszakos vízmedencéi menedéket adnak a különleges kiszáradástűrő vízinövényeknek is (Volk, 1984; Gaff és Giess, 1986). Több toleráns zárvatermőt és harasztot is találtak szemiarid vagy sivatagi mezőkön, szavannákon, különösen a nem állandó vagy sekély talajú területeken (Eickmeier, 1983; Gaff, 1987; Gaff és Sutaryono, 1991; Kappen és Valladares, 1999). Akad néhány kivétel is, mint például a *Boea hygroscpica* (Gaff, 1981) és a *Pentagramma triangulris* (Alpert és Oliver, 2002), amelyek nem ebben a szűk niche-ben élnek, hanem az erdei aljnövényzet szintjében találhatók.

2. ábra A kevés, Európában előforduló kiszáradástűrő edényes növényt is sziklakiemelkedéseken, törmeléklejtőkön találjuk. A képen virágzó *Ramonda nathaliae* látható.

Annak ellenére azonban, hogy ezek a növények képesek tolerálni az intenzív és hosszú ideig tartó kiszáradást, mégis vannak olyan sziklakiemelkedések, száraz mikroélőhelyek, amelyek kopárak maradnak. Azt, hogy egy területen megjelennek-e, és ha igen, akkor milyen faji összetételben a kiszáradástűrő növények alapvetően két dolog befolyásolja: 1,) a napsugárzásnak való kitettség; 2,) milyen vízforrás áll rendelkezésre az újranedvesedéshez. Az utóbbi esetben a mohák, zuzmók és algák számára elegendő a harmat vagy a köd (Tuba és mtsai., 1998), sőt azoknak a zuzmóknak, amelyekben a szimbionta egy zöldalga és nem

cianobaktérium, a levegő páratartalma is elegendő fotoszintézisük helyreállítására (Hahn és mtsai., 1993; Schroeter és mtsai., 1994; Kappen és Valladares, 1999). Ezzel szemben az edényes növények csak az esővízből tudnak vizet felvenni. A kitettség pedig valószínűleg a szénháztartáson keresztül befolyásolja a megtelepedés lehetőségét. A mérsékelt övben lévő lejtős területeken élő mohák vagy zuzmók az éjszakai eső vagy harmat után sokkal gyorsabban száradnak ki, ha a lejtő keleti vagy déli oldalán élnek, mintha az északi vagy nyugati oldalon nőnek (Kappen és mtsai., 1980; Alpert és Oechel, 1985). Az északi vagy nyugati oldalon élő növények sokkal inkább tudják pótolni az éjszaka elszenvedett légzési veszteséget, mert több idejük marad a fotoszintézisre addig, amíg újra ki nem száradnak. Ez valószínűleg részleges magyarázat arra, hogy a mohák általában miért a fák északi oldalán nőnek.

Az a tény, hogy a kiszáradástűrő növények csak egy viszonylag szűk niche-ben képesek versenyezni a kiszáradásérzékeny társaikkal azt bizonyítja, hogy ennek a képességnek vitathatatlan evolúciós előnye mellett negatív hatása van a produktivitásra. Ennek az összefüggésnek a molekuláris tisztázása alapvető segítséget jelentene nem csak a szárazságstressz, hanem valamennyi hasonló stressz okozta produktivitás-csökkenés megértésében.

2.1.4. A kiszáradástűrő edényes növények taxonómiai osztályozása

Porembski és Bartholt (2000) szerint az edényes növények közül megközelítően 330 faj kiszáradástűrő. Az újjáéledő növények 9 családja tartozik a harasztok törzsébe és 10 család a zárvatermők törzsébe. A nyitvatermők körében újjáéledő növények nem ismertek, csak a *Welwitschia mirabilis* mutat gyenge kiszáradástűrést (Gaff, 1972).

A harasztok néhány családjában, *Isoetaceae, Davalliaceae, Grammitidaceae, Hymenophyllaceae*, csak egy-egy kiszáradástűrő faj ismert (Proctor és Pence, 2002). Ezzel szemben a *Selaginellaceae, Adiantaceae, Aspleniaceae, Polypodiaceae, Schizaceae* családok gazdagok újjáéledő fajokban (Gaff, 1977; Gaff és Latz, 1978; Kappen és Valladers, 1999; Porembski és Bartholt, 2000).

A zárvatermők közül az egyszikűek családjai sokkal fajgazdagabbak. A *Velloziaceae* család közel 200 bizonyítottan kiszáradástűrő fajjal rendelkezik (Kubitzki, 1998). A *Poaceae* családban legalább 39 faj toleráns (Gaff, 1977). Egy kis család, a *Myrothamanceae*, teljes egészében kiszáradástűrő (Porembski és Bartholt, 2000). Sutaryono és Gaff (1992) legalább

15 fajt mutatott be, főleg a *Sporobolus* és *Eragrostis* genusz tagjait, melyek potenciális takarmányfüveknek tekinthetők. Az újjáéledő növények emészthetőségét és toxicitását szarvasmarha takarmányozási kísérletekben tesztelték, összehasonlítva más trópusi takarmánynövénnyel és a búzával. Az *Eragrostis nindensis* poikilohidrikus fű széles körben elterjedt Namíbiában és jó minőségű takarmány a szarvasmarhának, különösen kis csapadékú, száraz évben.

A kétszikű újjáéledő növények számos faja a *Scrophulariaceae* családból származik. Ide tartozik a *Chamaegigas intrepidus* is, amely a namíbiai gránitrétegek mélyedéseiben él és mint újjáéledő vízinövényt tartjuk számon. A dehidratált növény 7-9 hónapig képes túlélni a vízhiányt, amíg a sziklamélyedések meg nem telnek néhány napra esővízzel. Az esős évszakban akár 20 hidratált/dehidratált ciklust is túlél, majd az év leghosszabb időszakát kiszáradt állapotban tölti, gyakran 60°C-os hőmérséklet mellett (Gaff és Giess, 1986; Schiller és mtsai., 1998, 1999). Fischer (1992) kimutatta, hogy a *Scrophulariaceae* családba tartozó tíz afrikai *Craterostigma* fajból kilenc poikilohidrikus, akárcsak a *Lindernia* genuszba tartozó tizenöt afrikai faj. Ennek a családnak legismertebb és legjobban tanulmányozott tagja a Dél-Afrikából származó *Craterostigma plantagineum* (3. ábra). Természetes élőhelyén 5-15 cm nagyságúra nő, a tőlevélrózsájából 3-6 cm nagyságú leveleket fejleszt. Virágai lilák vagy rózsaszínűek. Az esős időszak beköszöntésekor újjáéled és 2 héten belül kivirágzik majd magot érlel.

3. ábra *Craterostigma plantagineum* az *in vitro* mikroszaporítás után kiültetve, üvegházi körülmények között

Az edényes kiszáradástűrő növényeket Európában a *Gesneriaceae* család 5 tagja képviseli. A *Haberlea rhodopensis* Délkelet-Európában a Balkán hegység őshonos faja. A *Ramonda* nemzetség tagjai szintén Európa hegyeinek endemikus fajai. A *R. nathaliae* és a *R.*

serbica a Balkán hegység lejtőin él, míg a *R. myconi* (4. ábra), vagy szinonim nevén a *R. pyrenaica,* a Pireneusok sziklakiemelkedésein nő. A három faj kiszáradástűrésének bizonyítását követően (Gaff és McGregor, 1979; Schwab és mtsai., 1989) az utóbbi időben számos élettani és molekuláris biológiai vizsgálatban választották modellnövényül (Müller és mtsai., 1997; Pico és mtsai., 2002; Degl'Innocenti és mtsai., 2008). A *R. myconi* 10-15 cm nagyságúra nő, erősen bokrosodik, tőlevélrózsájából 3-5 cm-es leveleket fejleszt. Tavasszal hozza lila, rózsaszín vagy fehér virágait.

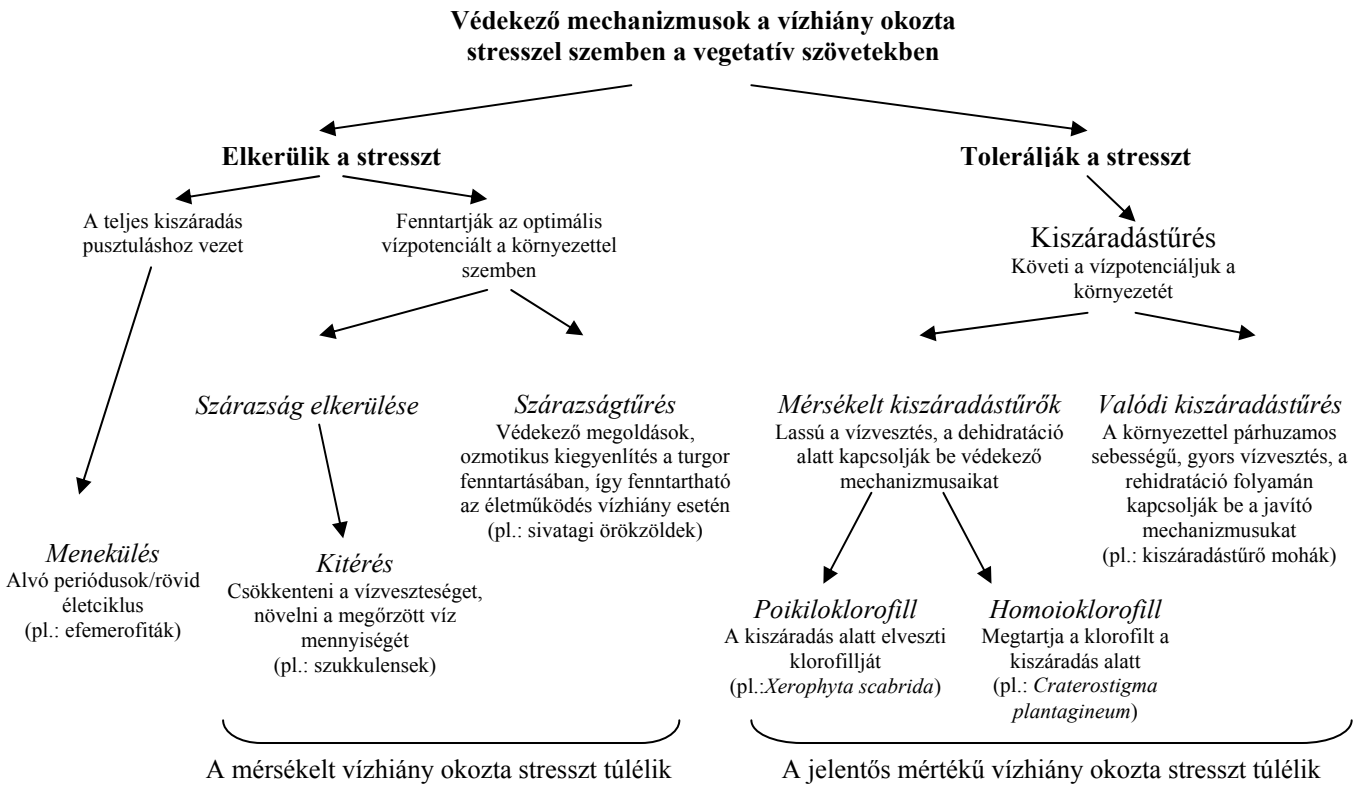
4. ábra A virágszín alapján két alfajt is megkülönböztetnek, a rózsaszín változat a *R. myconi rosea*, illetve a képen látható a fehér virágú *R myconi alba*.

A család ötödik tagja a *Jankaea heldreichii*, amely kizárólag a görögországi Olympos hegységben fordul elő (Siljak-Yakovlev és mtsai., 2008), és a *R. serbica*-val együtt védett növényfajok az Európai Unióban.

2.1.5. A kiszáradástűrés mechanizmusa

Az 1970-es évek végéig általános volt az a nézet, hogy a növények kiszáradástűrése mechanikus, tehát olyan szerkezeti tulajdonságok, mint a rugalmas sejtfal, a kicsi vakuólumok és a plazmahidak hiánya elegendőek a kiszáradás túléléséhez. Bewley 1979-es közleménye volt a fordulópont, amiben azt állította, hogy a kiszáradástűrés alapvetően protoplazmatikus természetű. Véleménye szerint a növénynek három feltételnek kell megfelelnie, annak érdekében, hogy túléljen egy komoly, protoplazmatikus vízvesztést: (1) korlátozni kell a sérülés nagyságát, (2) kiszáradt állapotban fenn kell tartani a növény fiziológiai egységét és (3) a javító mechanizmusnak a rehidratáció ideje alatt be kell indulnia. Bewley és Oliver (1992) szerint a kiszáradástűrés a sejt védelmére alapuló mechanizmussal és a kiszáradás okozta károsodás javításának a mechanizmusával magyarázható.

A kiszáradástűréshez kapcsolódó védelmi mechanizmusok alapvetően annak függvényében változnak, hogy milyen gyors a vízvesztés a kiszáradás során. A kevésbé összetett felépítésű zuzmók és mohák, miután méretüknél fogva sem alkalmasak a víz hosszabb ideig való tárolására (Proctor és mtsai., 1998), néhány perc vagy óra alatt kiszáradnak. Az ilyen növényeket, amelyek nem képesek szabályozni a vízháztartásukat, azaz a hidratáltsági állapotuk a közvetlen környezetükkel azonos, poikilohidrikus növényeknek nevezzük. Ezzel szemben az edényes újjáéledő növények döntő többsége a homoiohidrikus csoportba tartozik, ahová egyébként a nem kiszáradástűrő növények jelentős hányada is. Ezek a növények igyekeznek a környezettől függetlenül hidratált állapotban tartani szervezetüket, ezért az ilyen típusú növények viszonylag lassan, néhány nap vagy hét alatt száradnak ki. Az ennél intenzívebb vízvesztést nem élik túl. A homoiohidrikus kiszáradástűrő növények két további csoportba oszthatók. Néhány vegetatív kiszáradástűrő faj a kiszáradás alatt (kiszáradt állapotban) a fotoszintetikus apparátusát lebontja és a klorofill tartalmát elveszti (Tuba és mtsai. 1998). Ezeket poikiloklorofill növényeknek nevezik. A poikiloklorofill növények kizárólag egyszikűek és jelenleg 4 család 8 nemzetségében ismertek (Proctor és Tuba 2002). A gyors vízvesztésnek ellenálló fajok az ősi, ún. homoioklorofill kiszáradástűrési stratégiájú csoportba tartoznak, ahol a növények a fotoszintetizáló apparátusukat megtartják (5. ábra).



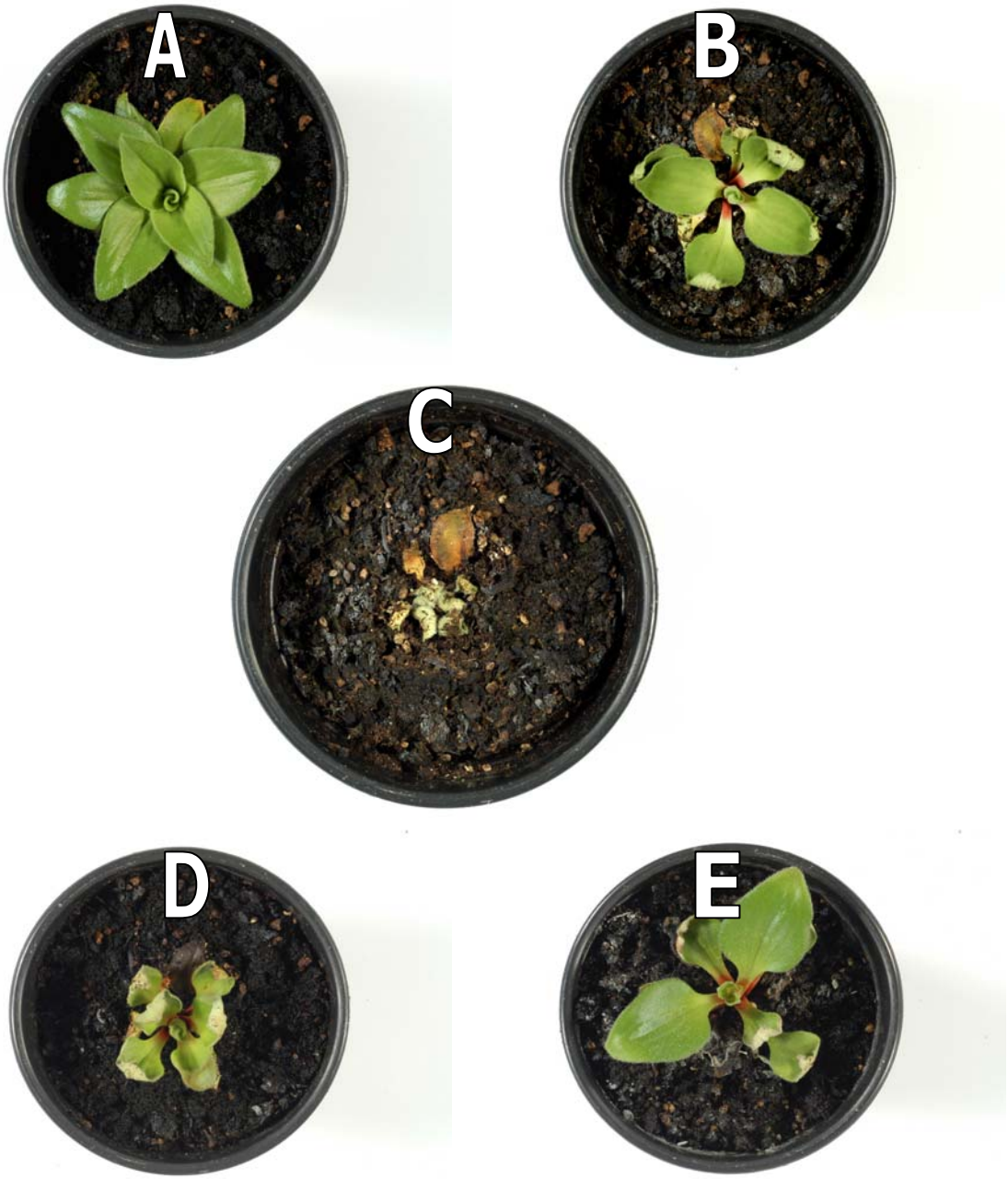
5. ábra A növények által alkalmazott mechanizmusok csoportosítása a vízhiány okozta stressz esetén (Forrás: Mundree és mtsai., 2002)

Itt érdemes megjegyezni, hogy a homoiklorofill növények sem egyforma mértékben őrzik meg klorofilljukat. Markovska és munkatársai (1994) nem találtak szignifikáns különbséget a kiszáradt és a hidratált állapotú *Haberlea rhodopensis* és a *Ramonda serbica* klorofilltartalmában. A klorofilltartalom megőrzéséből eredő következmények kezelésére a *R. serbica* két különböző mechanizmust használ. Az egyik esetben a CO_2 asszimilációt korlátozza a növény a sztóma sejtek bezárásával, aminek következménye, hogy a protonkoncentráció megnövekszik és a kialakuló alacsony pH szignálként beindítja a violaxantinból zeaxantinná való átalakulást és a nem-fotokémiai fluoreszencia kioltás (non-photochemical quenching – NPQ) mechanizmusát. Ez fontos szerepet játszik a gerjesztési energia hő formájában történő elvezetésben (Degl'Innocenti és mtsai., 2008). A másik mechanizmus, ami a nagyon alacsony relatív víztartalom mellett indul be, az a luteinen keresztül kialakuló klorofil tripletek megjelenése. Ez megakadályozza a rekatív oxigéngyökök keletkezését, amit a *Boea hygroscopica* esetében bizonyítottak (Navari-Izzo és mtsai., 1994). A fentebbiekkel szemben Drazic és mtsai. (1999) azt tapasztalták, hogy a *R. nathaliae* üvegházi körülmények között klorofill tartalmának 20 %-át, míg természetes körülmények között 70 %-át elveszítette. A *Myrothamnus flabellifolia* thilakoid szerkezetét megőrzi, de klorofill tartalmának 50 %-át elveszti (Farrant és mtsai., 1999).

A kiszáradás mértékére jellemző, hogy a szövetek eredeti víztartalmuk 70-95 %-át elveszítik (Pessin, 1924; Child, 1960; Oppenheimer és Halevy, 1962; Kappen, 1964; Stuart, 1968; Gaff és Churchill, 1976; Reynolds és Bewley, 1993). Ilyen kiszáradt állapotban az újjáéledő növények évekig életképes állapotban maradnak. Gaff (1977) 37 zárvatermő kiszáradástűrő fajt vizsgált meg és azt találta, hogy valamennyi faj túlélte a 3,5 év kiszáradt állapotban töltött időt, sőt két faj, a *Xerophyta squarrosa* és a *Craterostigma setifera*, 100 %-os túlélést mutatott 5 év után is.

Az eső vagy a hajnali harmat hatására a kiszáradt szövetek rehidratálódnak. A poikilohidrikus fajok ugyanolyan gyorsan, percek vagy órák alatt, elérik a teljes hidratáltságot, mint ahogy elveszítették. A zuzmók és a mohák általában 15 percen belül hidratálódnak, 1 órán belül elkezdenek fotoszintetizálni és alig 24 óra múlva helyreáll a teljes fotoszintetikus aktivitás (Alpert és Oechel, 1987; Csintalan és mtsai, 1998, 1999). A harasztoknak és a zárvatermőknek legalább 12 óra szükséges a rehidratációhoz és néhány nap a fotoszintézis teljes helyreállásához, azonban a *Craterostigma plantagineum*nak már 2-3 óra is elegendő (6. ábra). A leglassabban a poikiloklorofill növények regenerálódnak. A *Xerophyta scabrida* kiszáradt leveleinek rehidratációja után 10-12 órával megkezdődik a tilakoid membránok helyreállítása és a klorofill szintetizálódás is beindul. A fotoszintetikus

apparátus újraszervezése a rehidratáció megkezdése után 72 órával befejeződik. A fotoszintetikus aktivitás is hozzávetőlegesen abban az időben áll helyre (Tuba és mtsai., 1993).



6. ábra A *Craterostigma plantagineum* a mérsékelten kiszáradástűrő növényekhez tartozik, ennek megfelelően csak a fokozatos kiszáradást képes túlélni. Laborkörülmények között a szobahőmérsékleten tömegállandóságig történő kiszáradás 2 hét alatt ment végbe (A, B, C). A rehidratáció már 2 órával az öntözés után megindult (D), 2 nappal később pedig már hajtásnövekedést tapasztaltunk (E).

2.1.5.1. Sérülések a kiszáradás és az újranedvesedés alatt

A víz kritikus fontosságú, alapvető alkotóeleme valamennyi élőlénynek, így elvesztése a kiszáradás során jelentős fizikai és fiziológiai változásokat eredményez. A kiszáradás számos celluláris és szubcelluláris stresszt eredményez:

- -1,5 és -3 MPa vízpotenciál értéknél megszűnik a turgornyomás, kb. 50-100 % relatív víztartalom mellett (Iljin, 1957; Vertucci és Farrant, 1995).
- -3 és -11 MPa vízpotenciál értéknél (25-45 % relatív víztartalom) a szabályozatlan metabolikus folyamatok következtében megjelenő szabadgyökök okoznak oxidatív stresszt (Hendry, 1993; Smirnoff, 1993; Vertucci és Farrant, 1995; Navari-Izzo és mtsai., 1997).
- -150 MPa-nál kisebb vízpotenciál értéknél (10 %-nál kisebb relatív víztartalom) destabilizálódnak, dezintegálódnak a makromolekulák (Leopold és Vertucci, 1986, Crowe és mtsai., 1992; Vertucci és Farrant, 1995).

A kiszáradás során, amikor a vízpotenciál a -3 és -4 MPa értéket eléri, a fotoszintetikus rendszer hatékonysága csökkenni kezd (Smirnoff, 1993; Csintalan és mtsai., 1998, 1999). A fotoszintetikus elektrontranszport rendszer a kiszáradás során viszonylag korán leáll, azonban a fotoszintetikus pigmentek még továbbra is elnyelik a fényenergiát, aminek eredményeként bekövetkezik a fotooxidatív stressz, ami szabad gyökök keletkezésével jár.

A vízvesztés a sejtek térfogatának csökkenésével is együtt jár, azonban a sejtfal kisebb mértékben húzódik össze mint a protoplazma, így a sejthártya elválik a sejtfaltól, ami sérüléseket eredményezhet.

A sejtorganellumok esetében is megfigyelhető károsodás. A mitokondriumok kettős membránja szerkeztileg degradálódik (Bewley és Krochko, 1982), ennek foka azonban nem függ a kiszáradás mértékétől. Az organellumok 24 órán belül visszanyerték normál struktúrájukat.

A rehidratáció során a legnagyobb veszélyt az oldott ionok kiáramlása jelenti. Az ion eflux a sejtmembrán károsodásának csak tünete, nem pedig oka (Levitt, 1980). Nagy mennyiségű vízvesztés mellett a kinetika és a membránkomponensek strukturális visszaállításának mértéke fontos paraméterek a kiszáradástűrés vizsgálatában. Amikor hipoozmotikus kezelésnek vetették alá a kiszáradásra érzékeny és kiszáradástűrő fajokat, az oldott anyag vesztés kisebb volt az újjáéledő növényekben és nagyobb a szárazságra érzékeny fajoknál (Schwab, 1986). A rehidratáció alatti membrán permeabilitás változás molekuláris

alapjai ma még nem ismertek. Spickett és mtsai. (1992) dehidratált kukorica gyökércsúcs sejtek ^{31}P-NMR vizsgálatát végezték el. A kiszáradás alatt szervetlen foszfát és foszfokolin növekedését észlelték. Az utóbbit a vízvesztés okozta membrán károsodással magyarázták. Emellett a gyökérsejtek citoplazmájának átmeneti lúgosodását tapasztalták. Hasonló kísérletet végeztek *Chamaegigas intrepidus* növénnyel, amelynél nagymértékű vízvesztést követően a szervetlen foszfát és foszfokolin szint nem változott (Schiller és mtsai., 1997) jelezve, hogy membránja erőteljesen védett.

A kiszáradás és az újranedvesedés során bekövetkező számos probléma leküzdése a kiszáradástűrő élőlények méretét is korlátozza. Jelenleg nem ismert olyan kiszáradástűrő állat, amely 5 mm-nél nagyobb. A növények közül a fás szárú *Myrothamnus flabellifolius* 3 m-es magassága a határ, mivel a gyökérnyomás és kapilláris hatás a xylémben megszakadt vízoszlopot a rehidratáció alatt ennél magasabbra nem képes visszaállítani (Alpert, 2006).

2.1.5.2. A védekezés és javítás mechanizmusai

Morfológiai, anatómiai változások

A kisszáradás túléléséhez az újjáéledő növényekben számos morfológiai és sejtszerkezeti változás zajlik le. Kiszáradás hatására a levél összezsugorodik a kisebb párologtató felület kialakítása végett. A levélzsugorodásban jelentős különbség tapasztalható az újjáéledő növények száraz levelei és a szárazságra érzékeny növények levelei között. A C*raterostigma* levelének felülete kevesebb mint 15 %-ára csökken, ha a növény víztartalma az eredeti érték 5 %-ára redukálódik (5. ábra). Ezzel szemben a dohány esetében, ha a víztartalom csökkenés ugyanekkora, a levélfelület csak 50 %-ra zsugorodik össze. Az újjáéledő növények, mint a *Ceterach* és *Craterostigma* hervadt leveleinek csökkent mérete epidermiszük intenzív ráncosodásával magyarázható, amit az elektronmikroszkópos vizsgálatok alátámasztanak. A kiszáradás ideje alatt a sejt összehúzódása a plazmamembrán és a sejtfal közötti citoplazma hidak kialakulását eredményezi. Ezt a jelenséget „cytorrhysis”-nek nevezik. A kutikula erőteljes ráncosodásakor ez a jelenség nélkülözhetetlen a sejtstruktúra funkcionális megőrzéséhez, a plazmodezmális kapcsolat megóvásához. Azoknál a fajoknál, amelyek kiszáradás esetén kiterjedt plazmolízist mutatnak, de nem alakítanak ki citoplazma hidakat a plazmamembrán és a sejtfal között, a plazmodezmális hálózat visszafordíthatatlanul

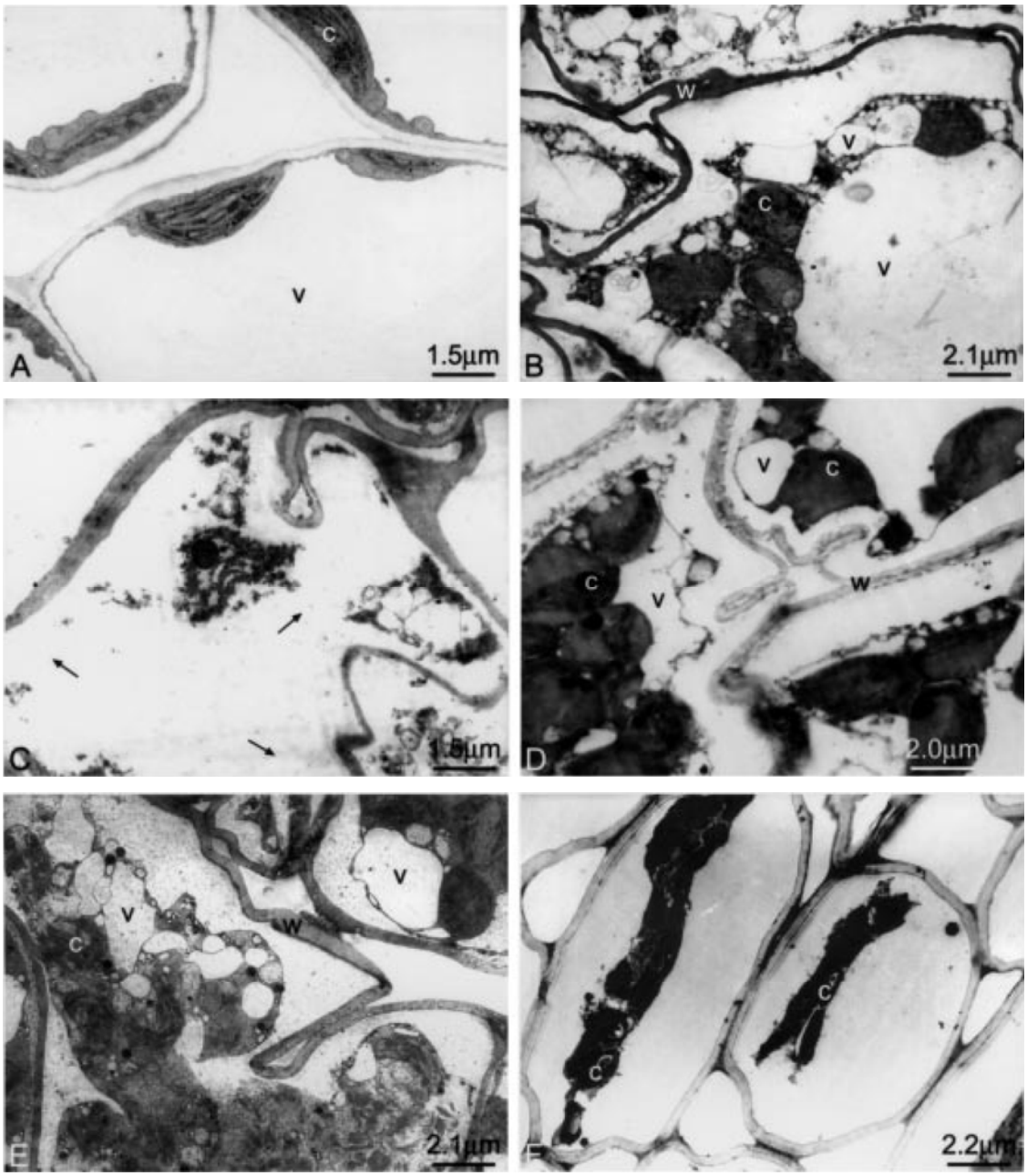
megszakad. A nagymértékben megrongálódott szövetek a rehidratációt nem élik túl, hacsak más mechanizmus nem biztosítja a kiszáradástűrést (Hartung és mtsai., 1998).

Az újjáéledő növények sejtfala szárazság esetén nagymértékben flexibilissé válik. A harmonikaszerű összehúzódás valószínűleg a szokatlan nyomás/térfogat arány miatt alakul ki ezekben a fajokban. Amint a szövet kiszárad, a vakuólumok összehúzódnak, a sejtfal összeráncolódik, megelőzve, hogy a sejtfal és a plazmalemma között túlzott feszültség alakuljon ki (Sherwin és mtsai., 1995). A sejtfalak rugalmassá válásában az úgynevezett „expanzin”-ok játszhatnak főszerepet (Jones és McQueen-Mason, 2004). A sejtfal magas relatív víztartalom mellett meglehetősen rideg állapotú, alacsonyabb relatív víztartalomnál rugalmassá válik. A sejtfal jelentős összehúzódása nemcsak a kiszáradástűrő növényeknél figyelhető meg, hanem specializált sejtekben is, mint például a kiszáradásra érzékeny *Peperomia* fajok hydrenchyma sejtjeiben. A hydrenchyma sejtek víztárolóként működnek. Vízvesztéskor a klorenchyma sejtek visszatartják a vizet, miközben a hydrenchyma sejtek összezsugorodnak, de ha a hidratáltsági állapot úgy engedi, hirtelen kifeszülnek (Schmidt és Kaiser, 1987).

A morfológiai változások típusát a vízvesztés sebessége is befolyásolja. Korábbi vizsgálatokban a mérsékelt kiszáradástűrés „stratégiáját” alkalmazó, úgynevezett homoiohidrikus növényeknél bizonyították, hogy a sejtfal összehajtogatódása, redőződése fontos szerepet játszik a mechanikai sérülések elkerülésében (Vicré és mtsai., 1999; Farrant 2000). *Craterostigma wilmsii*-vel végzett kísérletekben gyorsan (20 óránál kevesebb idő alatt) és a természetest megközelítő sebességgel (8 nap latt) szárították ki a növényeket. Azt tapasztalták, hogy akkor jelent meg először a sejtfak összehajtógatódása, amikor 50 % alá esett a relatív víztartalom, maximumát pedig 40-25 %-os értéknél érte el. A gyorsan kiszárított növényeknél sérülések keletkeztek a sejtfalon és a sejtek belső struktúrája sok esetben felismerhetetlenné vált. Azonban meglepő módon képesek voltak túlélni, ha a gyorsan kiszáradt növényeknél nem volt nagyfokú a sérülés. További vizsgálatok során a rehidratációs oldatba distamycin A-t vagy cyclohexamid-ot (transzkripciós és transzlációs inhibitortok) adagoltak. A gyorsan kiszárított növények nem élték túl az ilyen rehidratációt, míg a kontroll csoportban, ahol csak vízet használtak a rehidratációhoz túléltek. Ebből arra lehet következtetni, hogy a *C. wilmsii* esetében is működhetnek ugyanazok a javító mechanizmusok, mint a poikilohidrikus fajoknál (7. ábra) (Cooper és Farrant, 2002).

Megjegyzendő, hogy egy növényen belül is eltérő szintű lehet a kiszáradástűrés mértéke. *Eragrostis ninidensis*-sel végzett kísérletek azt bizonyították, hogy sem a fiatal hajtások sem a külső érett levelek nem kiszáradástűrőek, míg a magok és az érett belső

levelek azok (Vander Willigen és mtsai., 2003). *C. plantagineum* esetében a gyökerek önmagukban is képesek voltak túlélni a kiszáradást levelek nélkül (Norwood és mtsai., 2003), míg a hidratált állapotú *Boea hygrometrica* növényről leválasztott levelek ugyancsak túlélték és rehidratálódtak a két napos kiszárítás után (Jiang és mtsai., 2007).



7. ábra (A) *Craterostigma wilmsii* hidratált mezofillum sejtjei. A sejtet egy nagy vakuolum uralja, a sejtalkotó kloroplasztizsok és a citoplazma a belső oldalfalhoz szorul. (B) A 40-25 % relatív víztartalmú, lassan kiszáradt *C. wilmsii* mezofillum sejt. Sok kisebb vacuolum és az összehajtogatódott sejtfal figyelhető meg. (C) A 40-25 % relatív víztartalmú, gyorsan kiszáradt *C. wilmsii* sérült mezofillum sejtjei. A sejtmembrán teljesen tönkrement, amit a nyilak mutatnak. (D) A 40-25 % relatív víztartalmú, gyorsan kiszáradt *C. wilmsii* sérülésmentes mezofillum sejtjei, amelyek ugyanúgy néznek ki, mint a lassan kiszáradt növényeknél: nagyfokú sejtfal redőzöttség és többfelé szeparálódott központi vakuolum. (E) A gyorsan kiszáradt *C. wilmsii* teljesen kiszáradt mezofillum sejtjei, amelyek szintén ugyanúgy néznek ki, mint a lassan kiszáradt növényeknél: nagyfokú sejtfal redőzöttség és többfelé szeparálódott központi vakuolum. (D) A gyorsan kiszáradt *C. wilmsii* teljesen kiszáradt sérült mezofillum sejtjei, amelyekben szinte teljes mértékben visszahúzódott a sejthártya a sejtfaltól. Jelmagyarázat: c – kloroplasztisz; v – vakuolum; w – sejtfal. (Forrás: Cooper és Farrant, 2002)

Az abszcizinsav (ABA), mint a védekezés jelátviteli szignálja

Az újjáéledő növények kiszáradástűrésében az abszcizinsav fontos szerepet játszik, elsősorban a jelátvitelben, azonban egyenlőre még kevés információval rendelkezünk a pontos hatásmechanizmusát illetően. A növények egy csoportjánál (*Vellozia tubuliflora, Borya nitida, Xerophyta dasyrioides*) két- háromszoros mennyiségű ABA halmozódik fel a levélben egy kiszáradási periódust követően. Ha a levél vízvesztése túlságosan gyorsan következik be, akkor az ABA-szint nem növekszik, és így a levél képtelen túlélni a kiszáradást (Gaff és Loveys, 1984).

Néhány fajban négy-, ötszörös ABA felhalmozódás figyelhető meg. A poikilohidrikus *Sporobolus stapfianus* esetében több adat áll rendelkezésünkre az abszcizinsavat illetően. A leghatározottabb ABA-szint emelkedés a sértetlen növény hajtásában fordul elő, hozzávetőlegesen tízszeres mennyiség. Megnyúlt levelekben csak kétszeres volt az ABA növekedés. A gyökérben gyenge válasz mutatkozott a kiszáradásra, a belső ABA-tartalom két-, háromszorosára emelkedett. A leválasztott szervek gyengén reagáltak a kiszáradásra. Összegezve elmondható, hogy a *S. stapfianus*-ban az ABA nem gyökér-hajtás stressz szignálként működik, hanem valójában a levelekből származik. Az ABA felhalmozódást csak sértetlen növény levelében tudjuk vizsgálni, mivel a levél a szignált a hajtás más részéből kapja (Hartung és mtsai., 1998). Gaff szerint el kell érni a dehidratáció küszöbét (10 %-os vízvesztés), hogy az ABA képződés növekedjen. *Craterostigma plantagineum* három-, hatszoros mennyiséget halmoz fel abszcizinsavból, a dehidratáció mértékétől és körülményeitől függően. Csak két másik poikilohidrikus növény, a *Craterostigma lanceolatum* és a *Chamaegigas intrepidus* növeli az ABA tartalmát 20-30-szoros mennyiségre, amikor kiszárad. A mezofitikus növényektől eltérően az ABA–konjugátumok mennyisége számos újjáéledő fajban nagy. A szabad és a kötött ABA aránya 1:2, de a legtöbb esetben 1 alatti. Az ABA–konjugátumok jelenléte a szövetek stresszeltségének indikátora (Weiler 1980).

Az abszcizinsavnak, mint szignál transzdukciós molekulának sok, kifejezetten kiszáradástűrő növényekben azonosított gén aktiválásában van szerepe. A *C. plantagineum*ból azonosítottak akvaporin géneket: *Cp-PIPa*, *Cp-PIPb*, *Cp-PIPc* és *Cp-TIP* (Mariaux és mtsai., 1998); LEA-szerű fehérjéket kódoló géncsaládot: *CDeT11-24* (Velasco és mtsai., 1998); a kiszáradás korai szakaszában a kloroplasztiszok újraszerelésében szerepet játszó gént: *CpPTP* (Phillips és mtsai., 2002); a szállítóedénynyalábok speciális védekezésében működő gént: *CpEdi-9* (Rodrigo és mtsai., 2004); a LEA fehérjék 4. csoportjába tartozó gént: *CpC2* (Ditzer

és Bartels, 2006); transzkripciós szabályozó gént: *CpHB-7* (Deng és mtsai., 2006), amelyek mindegyike ABA indukálható. *Xerophyta viscosa*-ból is azonosítottak két ABA indukálható gént: 1) *XvPerl*, amelynek szerepe a sejtmagon belüli DNS védelemeben lehet az oxidatív sérülésekkel szemben (Mowla és mtsai., 2002); 2) *XVSAP1*, amelynek a vízhiány során a membrán stabilizálásában van szerepe (Garwe és mtsai., 2003).

Ezzel párhuzamosan a kiszáradás alatt olyan gének is aktivizálódtak, amelyek ABA hatására nem indukálódtak. Ez azt erősíti, hogy az ABA-tól független jelátviteli utak is működnek a *C. plantagineum*ban (Frank és mtsai., 2000). Továbbá az abszcizinsavnak sok olyan hatása is van, amelyek nem kifejezetten a kiszáradástűréssel kapcsolatosak. Például sejt ciklus gátló (Wang és mtsai., 1998); szabályozza a sztóma sejtek mozgását (Wilkinson és mtsai., 2002); növekedés gátló (Farnsworth, 2004); szerepet játszik a növény-kórokozó kapcsolatban (Mauch-Mani és Mauch, 2005).

Oxidatív stressztermékek detoxifikációja

A fotoszintetizáló szövetek túlzott fényabszorpciója reaktív oxigéngyökök keletkezését idézi elő (Hideg, 1996), amely fokozza a membránfehérjék és lipidek degradációját. Ennek kivédésére a növények egy csoportja (poikiloklorofill típusúak) egyszerűen elbontja fotoszintetizáló rendszerét, így nincs lehetőség a káros fényabszorpcióra, következésképp nem keletkeznek szabadgyökök ebből a forrásból. A másik lehetőség, hogy az újjáéledő növényekben hatékonyabb az antioxidáns védekező rendszer (glutation, aszkorbátok, tokoferolok) és aktívabbak a szabadgyök semlegesítő enzimek (SOD – szuperoxid dizmutáz, AP – aszkorbát peroxidáz, GR – glutation reduktáz, katalázok)(Kranner és Birtic, 2005). A kiszáradástűrő *Sporobolus stapfianus* a kiszáradás folyamán növeli a GR koncentrációját és csökkenti az AP aktivitását. A *Boea hygroscopica* GR aktivitása csökken, míg az AP aktivitás azonos szinten marad, miközben gluthationt akkumulál (Sgherri és mtsai., 1994) Szintén glutathiont halmoz fel a kiszáradás alatt a *Myrothamnus flabellifolia* és a *Boea hygrometrica* (Kranner és mtsai., 2002; Jiang és mtsai., 2007). A *Xerophyta viscosa* AP és SOD aktivitása növekszik kiszáradáskor, de a GR aktivitás változatlan marad. A *Craterostigma wilmisii* AP aktivitása a kiszáradás alatt emelkedik, míg a SOD és GR aktivitás a rehidratáció alatt emelkedik folyamatosan (Sherwin és Farrant, 1998). A *Haberlea rhodopensis* vizsgálat azt mutatta, hogy a SOD és peroxidáz szintjének változása a kiszáradásra nagyon gyorsan végbemegy, de a növény fejlettségi állapota ezt befolyásolja (Yahubyan és mtsai., 2009).

Az oxidatív steresszhatások kivédésében kritikus szerepet játszó glutationnak – hasonlóan az abszcizin savhoz – a sejtekben más funkciója is van, mint például kén raktározás és szállítás, szabályozza az enzim aktivitást, transzkripciót, transzlációt, nehézfém megkötő, stb. (Grill és mtsai., 2001).

Cukrok szerepe a védekezésben

A növények ozmotikus egyensúlyának fenntartásában kulcsszerepük van az egyszerű cukroknak. A kiszáradás során ezek az anyagok a víz helyettesítésével stabilizálják a membránokat és makromolekulákat.

Az alacsonyabb rendű növényi szervezeteknél, gombáknál, élesztőnél és baktériumoknál a kiszáradástűrésben a központi szerepet egy diszacharid, a trehalóz játsza (Leprince és mtsai., 1993). Infravörös spektroszkópiás vizsgálatokkal meghatározták a trehalóz hatásmechanizmusát, miszerint ez a molekula a saját hidroxil-csoportjai és a fehérjékben lévő poláris gyökök között létesít H-kötéseket (Crowe és mtsai., 1992), mintegy helyettesítve az elpárologtatott vizet.

In vitro a szarkoplazmatikus retikulum membránjának kiszáradása és rehidratációja általában a vezikulumok fúzióját és a Ca^{2+} transzportáló képességének elvesztését eredményezi (Crowe és mtsai., 1983). Amikor azonban a kiszáradástűrő élő szervezetben megfelelő koncentrációban trehalóz volt jelen, a működő vezikulumok megmaradtak és a Ca^{2+} transzport is zavartalanul működött tovább. A trehalóz általában nem fordul elő növényekben. Három újjáéledő növényfajban mutattak ki trehalóz felhalmozódást: a *Selaginella lepidophylla*-ban (Adams és mtsai., 1990), a *Myrothamnus flabellifolius*-ban (Bianchi és mtsai., 1993; Drennan és mtsai., 1993) és a *Sporobolus stapfianus*-ban (Albini és mtsai., 1994).

Más újjáéledő növények nem trehalózt akkumulálnak, hanem az eltérő szénhidrát anyagcseréjükből fakadóan más anyagot mozgósítanak. Az e témában legjobban tanulmányozott *Craterostigma plantagineum* szacharóz szintáz enzim aktivitása a dehidratációs és rehidratációs állapotnak megfelelően folyamatosan változik (Kleines és mtsai., 1999). Azonban a *C. plantagineum* nem szacharózt akumulál hanem normális víztartalom (hidratált állapotban) mellett egy ritkán előforduló monoszacharidot, a nyolc szénatomos 2-oktulózt tartalmazza, mely szárazanyagának 50 %-át teszi ki. A 2-oktulózt vízvesztés esetén a növény gyorsan lebontja és szacharózzá alakítja át (Scott, 2000; Norwood és mtsai., 2000). Ha ismét megfelelő mennyiségű vízhez jut a növény, akkor a szacharóz

visszaalakul 2-oktulózzá. Kiszáradás esetén, amikor a sejtek nagy mennyiségű vizet veszítenek, a szacharóz képes a kilépő víz helyére áramlani és ott, a száraz membránok fizikai tulajdonságait úgy módosítani, hogy azok teljesen hidratált biomolekulákhoz hasonlítanak (Ingram és Bartels, 1996). *Ramonda* és *Haberlea* fajok esetében is megfigyelhető a szaharóz szint emelkedés (Müller és mtsai., 1997). A szacharóznak fontos szerepe van a membrán és fehérje struktúrák stabilizálásában teljes kiszáradás esetén (Crowe és mtsai., 1987). Kísérletek bizonyítják, hogy a pollen (Hoekstra és mtsai., 1989) és embrió túlélés (Black és mtsai., 1996) nagy mennyiségű szacharóz akkumulációval áll korrelációban.

Strauss és Hauser (1986) a szacharóz védelmi működésének vizsgálatához az európium iont (Eu^{3+}) használták. Foszfatidilkolin vezikulák és szacharóz preparátumához európium iont adtak. Hűtve szárítás során európium iont juttattak a rendszerbe, aminek hatására a szacharózzal stabilizált liposzómák stabilitása csökkent. A szacharóz és az európium ion a foszfolipidek foszfát csoportjaihoz kompetitíven kapcsolódtak. A végső következtetés szerint a szacharóz valószínűleg a száraz membránban a foszfát csoportok között alakít ki kötéseket.

A szacharóz védő hatását a raffinóz jelenléte erősíti, amely megelőzi a cukor kikristályosodását és lehetővé teszi az ún. biológiai üveg kialakulását (Koster, 1991; Lin és Huang, 1994; Black és mtsai., 1996). Ezt erősíti, hogy *Xerophyta viscosa* esetében mind szaharóz, mind raffinóz akkumulációt megfigyeltek (Peters és mtsai., 2007). A kiszáradás alatti szacharóz kristályosodást elkerülő hatékony szacharóz/raffinóz moláris arány kevesebb, mint 20:1 (Lin és Huang, 1994). A biológiai üveg tulajdonképpen túltelített cukoroldat (Koster, 1991), amely amorf, üvegszerű tulajdonságokkal rendelkezik. Ezt az üvegszerű formát csírázóképes kukoricaszemekben is kimutatták és azt is, hogy kapcsolatban van a szemek életképességével (Williams és Leopold, 1989). A biológiai üveg kialakításáért valószínűleg a cukrok összetétele, nem pedig a mennyisége a felelős (Koster, 1991; Buitink és Leprince, 2008).

Fehérjék szerepe a védekezésben

A kiszáradás túlélésében az egyszerű cukrok mellett a fehérjék játszák a legfontosabb szerepet. A fehérjék két csoportja vált ismerté, mint aktív komponens a vízdeficitre adott válaszreakcióban. Az egyik csoport a magok érési folyamatának tanulmányozásakor azonosított késői embriógenezis fehérjék (late embryogenesis abundant – LEA – protein), a másik csoport a hősokk fehérjék (heat-shock proteins, HSPs).

A magvak érési folyamatában az utolsó lépés a vízvesztéssel járó nyugalmi fázis elérése. Ilyen nyugalmi fázisban lévő gyapot magokat tanulmányozva írták le először a LEA fehérjéket (Galau és Hughes, 1987), amelyek a teljes oldható fehérjetartalom 2 %-át, a nem-raktározott fehérjéknek pedig 30 %-át tették ki (Roberts és mtsai, 1993). Mára számos LEA fehérjét azonosítottak, amelyeket szekvenciális hasonlóságuk miatt 6 csoportba osztottak (Dure és mtsai., 1989; Ingram és Bartels, 1996; Cuming, 1999). A LEA fehérjék sejtes védekezésben játszott szerepét bizonyította az a kísérlet, amikor az árpából származó 3-as *lea* csoportba tartozó *HVA1* génnel transzformáltak rizst és azt tapasztalták, hogy a konstitutíven expresszáló gén növelte a vízhiánnyal és sóstresszel szembeni toleranciát (Xu és mtsai., 1996). A LEA fehérjék szintézise erősen indukált szinte valamennyi kiszáradástűrő növény vegetatív szöveteiben a kiszáradás alatt (Bartels és mtsai, 1993; Blomstedt és mtsai, 1998; Bartels, 1999). *Craterostigma plantagineum*ból sikerült azonosítani és részlegesen jellemezni az 5-ös LEA csoportba tartozó *CDeT27-45*, a 2-es csoportba (dehidrinek) tartozó *CDeT6-19* (Michel és mtsai., 1994), a 4-es csoportba tartozó *CpC2* (Ditzer és mtsai., 2001; Ditzer és Bartels, 2006) valamint a csoportba eddig nem sorolt LEA-szerű *CDeT11-24* (Velasco és mtsai., 1998) és *CpEdi-9* (Rodrigo és mtsai., 2004) géneket. A LEA fehérjék felfedezése óta eltelt több mint 20 év alatt egyre gyarapodik számuk és a kiszáradáshoz kapcsolt szerepük is egyértelmű bizonyítást nyert, azonban valódi funkciójukat a mai napig nem ismerjük (Wise és Tunnacliffe, 2004).

A hősokk fehérjéknek 5 osztályát különítik el: Hsp90, Hsp70 (DnaK), GroEL, Hsp60, Hsp100 (Clp) és sHSP-k (Wang és mtsai., 2004). A növényekben található kis hősokk fehérjéket (small HSP, sHSP) génszekvenciájuk hasonlósága, immunológiai reakcióik és intracelluláris elhelyezkedésük alapján további 6 csoportba sorolják (Waters és mtsai., 1996). A kiszáradás alatt a sHSP fehérjék fontos szerepet játszanak a sejtes védekezésben. Sok növényfaj érő magvaiban felszaporodnak a kiszáradásakor (Vierling, 1991; Wehmeyer és mtsai., 1996). Alamillo és mtsai. (1995) arról számoltak be, hogy a sHSP-ek expressziója folyamatos a *Craterostigma plantagineum* vegetatív szöveteiben és a kiszáradás során növekszik a felhalmozódásuk. A HSP-ek konstitutív expressziója vegetatív szövetekben szokatlan jelenség és expressziós mintázatuk a magokéhoz hasonlít. Jelentős szerepet játszanak a fehérjék hőstabilizálásában, elsősorban membránkötött fehérjék megvédésében hatékonyak (Jinn és mtsai., 1993). Az élesztőből származó HSP12, ami nagyon hasonlít a LEA fehérjékhez, képes a liposzóma membránok védelmére a kiszáradás idején, hasonlóan a trehalózhoz (Sales és mtsai., 2000). Az organellumba transzportálódó HSP22 kimutatható volt a kloroplasztisz gránum membránjához asszociálódva. Feltehetően a fotoszintetikus

reakciócentrumokat védik különböző stresszhatások és fotoinhibíció során (Adamska és Kloppstech, 1991). *In vitro* kísérletek bizonyítják, hogy a sHSP-ek nemcsak passzív védőfunkciót látnak el, hanem molekuláris chaperone-ként is működnek. Az olyan segítő fehérjéket, amelyek a fehérjeszintézis és a fehérjetranszport korrekt menetéhez szükségesek, de maguk nem részei a végső komplexnek, molekuláris chaperone-oknak nevezték el (Ellis, 1990). A feltekeredő fehérjére vonatkozó sztérikus informácót nem hordoznak. Alapvető feladatuk, hogy az összerendeződési folyamatok során az energetikailag viszonylag stabil, de inkorrekt konformációk kialakulásának valószínűségét a minimumra csökkentsék, azaz a fehérjéket megóvják a hidrofób oldalláncok által megvalósuló irreverzibilis denaturációtól. Hasonlóan a LEA fehérjékhez a HSP fehérjék funkcióit is sokan vizsgálták a mai napig, de a pontos szerepük még felderítésre vár (Kalemba és Pukacka, 2007).

Az újjáéledő növények kiszáradása során számos más fehérjét is azonosítottak, de szerepük még nem tisztázott a kiszáradástűrésben (Kuang és mtsai, 1995; Ingram és Bartels, 1996; Blomstedt és mtsai, 1998; Bockel és mtsai, 1998; Neale és mtsai, 2000).

A kiszáradás alatt nem csak a védő fehérjék, illetve a fehérjéket védő anyagok keletkezése része a védekező mechanizmusnak, hanem foszforilációjuk is (Röhrig és mtsai., 2006), illetve az őket kódoló gének expressziójának szabályozása sRNS-eken keresztül (Phillips és mtsai., 2007).

2.1.6. A kiszáradástűrés kutatásában alkalmazott megközelítések

A kiszáradástűrés képességét sokféle irányból igyekeznek felderíteni. A fonálférgek közül a *Panagrolaimus superbus*, mint modell rendszert használják az anhidrobiózis folyamán jelentkező géncsendesítés vizsgálatában (Shannon és mtsai., 2008). A medveállatkák (*Milnesium tardigradum*) tojásokat rakva szaporodnak, amelyek kelési arányát érettségi állapotuktól függően befolyásolja a kiszáradás (Schill és Fritz, 2008). A felnőtt példányok élethosszát belső órájuk szabja meg, a kiszáradt állapotban eltöltött idő úgy tűnik nem befolyásolja (Hengherr és mtsai., 2008). A kiszáradás alatti cukrok és poliolok felhalmozása játszik fontos szerepet egyes uróvillások (*Cryptopygus antarcticus*) túlélésben az anktartiszi tél alatt (Elnitsky és mtsai., 2008).

A növényi szárazságstressz és kiszáradástűrés megismerésében három különböző stratégiát alkalmaznak: a.) vizsgálják a stressz hatásait az agronómiailag jelentős növényeken; b.) kiszáradástűrő rendszereket – magokat, újjáéledő növényeket – tanulmányoznak; c.)

genetikai modellnövényekből mutánsokat izolálnak, majd összehasonlító elemzéseket végeznek (Ingram és Bartels, 1996).

2.1.6.1. Mezőgazdaságilag fontos növények

Az agronómiailag jelentős növények esetében a kutatások azt a lehetőséget használják ki, hogy az intenzív nemesítés során létrejött fajták a szárazságtűrés különböző fokozataival rendelkeznek. Ezek a fokozatbeli különbségek vélhetően megjelennek a szárazságra adott molekuláris válaszokban is, amelyeket összehasonlító vizsgálatokban elemeznek ki. Az itt megszerzett információk mind a klasszikus, mind a molekuláris növénynemesítésben hasznosíthatók. Emellett a szárazságtűrésben már azonosított gének bejuttathatók ezekbe a növényekbe és ott élettani szerepük tovább vizsgálható. Később, ezek a transzgénikus növények felhasználhatók a szárzságtűrés fokozásában, mint nemesítési alapanyag (Ingram és Bartels, 1996).

Összehasonlító vizsgálatokat végeztek 9 különböző rizs hősokk génnel (*OsHSP*). A gének expressziója különbözött az abiotikus stressz hatásokra és az ABA kezelésekben. Ebből egyértelműen arra lehet következtetni, hogy különböző szerepet töltenek be a stresszel szembeni reakciókban (Zou és mtsai., 2009). Ezzel szemben a *rHsp90* gén expressziójának fokozódását egyaránt megfigyelték magas sókoncentráció, magas pH, magas hőmérséklet és szárazság esetén. Ez alapján különböző stresszahtásokra ugyanaz a gén expressziója erősödik rizsben (Liu és mtsai., 2006). Szántóföldi körülmények között még nem kerültek kipróbálásra szárazságtűrésben szerepet játszó génekkel transzformált rizs növények, azonban laboratóriumi körülmények között mind a LEA, mind a hősokk géneket tartalmazó transzgénikus növényeknek javult a szárazságtűrésük (Hu és mtsai., 2008; Sato és Yokoya, 2008; Wu és mtsai., 2009).

A 3 napnál nem idősebb búza csíranövények kiszáradástűrőek, míg gyökérzetük és az idősebb hajtások nem. Ezt felhasználva modell rendszert dolgoztak ki a kiszáradástűrés és érzékenység vizsgálatára (Farrant és mtsai., 2004; Niedzwiedz-Siegien és mtsai., 2004).

Az abszcizin savra adott válasz reakciók evolúciós vizsgálatában az 1-es csoportba tartozó *LEA* gének expresszióját hasonlították össze moha és árpa növényekben (Kamisugi és Cuming, 2005).

2.1.6.2. Kiszáradástűrő rendszerek

A jelenlegi kutatások alapvetően két kiszáradástűrő rendszer vizsgálatára irányulnak: a magokéra és az újjáéledő növényekére.

A magok fejlődésének végső érési stádiuma a kiszáradással jellemezhető, ekkor a mag a teljes víztartalmának 90 %-t elveszíti és nem detektálható metabolizmusú, alvó stádiumba jut. Ez a kiszáradt állapot teszi lehetővé a magvak szélsőséges környezeti feltételek melletti túlélését és a széles elterjedést. Az embrióban a kiszáradástűrési képesség általában már az érés előtt kialakul, de a csírázás során fokozatosan elvész. Számos faj magját felhasználták mRNS és fehérje izolálásra, hogy összefüggést találjanak a kiszáradástűrés képességével. A helyzet azonban meglehetősen bonyolult, mert nehéz elkülöníteni a kiszáradástűrést irányító folyamatokat a fejlődés egyéb útjait irányító folyamatoktól. A legnagyobb eredmény, hogy a magok molekuláris tanulmányozása során azonosították és leírták a fentebb már említett LEA fehérjéket (Ingram és Bartels, 1996).

Búza magok fejlődése során 5 LEA gén expressziójának változását mérték kiszáradás, hideg, só és ABA hatására, valós idejű kvantitatív RT-PCR segítségével. A gének indukciós szintje 8-100 000-szer nagyobb volt a normál állapothoz képest. Az 5 gén funkciójának vizsgálatát transzgénikus növényekben tervezik elvégezni (Ali-Benali és mtsai., 2005).

A magok érési folyamatának szabályozásához térben és időben a különböző jelátviteli utak összehangolt együttműködésére van szükség. Erről az utóbbi időben számos új ismeret keletkezett (Gutierrez és mtsai., 2007), ugyanakkor az is kiderült, hogy a magokban raktározott anyagok különbözőek, így feltételezhetően különböznek a szabályozó utak is az egyes növényfajokban (Gutierrez és mtsai., 2006).

Az újjáéledő növények kiszáradástűrő képességükkel tűnnek ki a zárvatermők köréből. A *Craterostigma plantagineum* kifejlett egyedeit vízmentes körülmények között tartva olyan transzkripciós és transzlációs szintű változások következnek be (Bartels és mtsai., 1990), amelyek lehetővé teszik a kiszáradás elviselését. Ez a növény azzal az előnyös tulajdonsággal rendelkezik, hogy mind a teljes növény, mind a dedifferenciálódott kallusz alkalmas a kiszáradástűrés molekuláris mechanizmusának vizsgálatához. A kallusz fázisban lévő sejtek előnyös sajátossága, hogy a bonyolult fejlődési folyamatoktól mentesen vizsgálhatók, szemben a magokkal vagy a kifejlett növényekkel.

Összehasonlító kísérletekben vizsgálták 4 újjáéledő növényfaj (*Craterostigma wilmsii, Sporobolus stapfianus, Xerophyta humilis, Xerophyta schlecteri*) szakítószilárdságának változását a kiszáradás alatt. Kontrollnak kukorica és lúdfű növényeket használtak. A fajok

szakítószilárdsága különbözőképpen változott a kiszáradás alatt, ami azt erősíti, hogy az újjáéledő képességüket más-más úton érik el (Hedderson és mtsai., 2009).

A kiszáradás alatti változások egyik legkritikusabb pontja a növények fotoszintetizáló rendszerének védelme, amit *Tortula ruralis*, *Hymenophyllum wilsonii* és *H. tunbrigense*, *Haberlea rhodopensis*, illetve poikiloklorofill növényeknél vizsgáltak (Csintalan és mtsai., 2000; Proctor, 2003; Georgieva és mtsai., 2007, 2008; Peeva és Cornic, 2009; Tuba, 2008).

2.1.6.3. Genetikai modellrendszerek

A kiszáradástűrés vizsgálatát máshonnan közelíti meg a genetikai modellrendszerek felállítása. A fenti két stratégiához képest ebben az esetben részletes genetikai információkkal rendelkezünk a modellnövényről vagy olyan molekuláris eszközök állnak a rendelkezésünkre, amelyekkel ezek az információk megszerezhetők.

Az utóbbi néhány évben a molekuláris technikák fejlődésével az emberi DNS teljes szekvenciájának megfejtése mellett számos kultúr- (pl.: rizs, kukorica) és modellnövény (*Arabidpsis thaliana*) bázissorrendjének leírása is megkezdődött vagy már be is fejeződött. A szekvenciákon belül azonban a gének lokalizálása és funkcionális analízise még hátra van. A genetikai modellrendszerekben a tradicionális kutatási paradigma szerint egy funkcióhoz igyekszünk megkeresni a megfelelő gént. Ezt a megközelítést előrefele haladó (forward) genetikának nevezik. Ezzel szemben a visszafelé haladó (reverse) genetika az adott géneknek keresi a funkcióját (Bouchez és Höfte, 1998).

Az első terület, ahol az utóbbi megközelítést sikeresen alkalmazták az EST-k (Expressed Sequense Tag) meghatározása volt. Az EST-ken a cDNS könyvtárakból kiválasztott klónok egyik vagy mindkét végének 300-500 bázispáros szekvenciáját értjük. A folyamatosan gyarapodó EST gyűjtemény használatával sok új gént sikerült azonosítani (Pereira, 2000). A kiszáradástűrő *Tortula ruralis*ból azonosított 152 EST (Wood és mtsai., 1999) vizsgálata során kiderült, hogy csak 30 %-uk mutat szignifikáns homológiát a már eddig azonosított szekvenciákkal. Érdekes, hogy közülük néhány, olyan *C. plantagineum*ból izolált (Bockel és mtsai., 1998) génekkel mutatott hasonlóságot, melyek funkciója nem ismert. Ezek a vizsgálatok alátámasztják azt az elképzelést, hogy a kiszáradástűrésben egyedi gének játszanak fontos szerepet, és egyben jelzik azt is, hogy lényeges különbség van a valódi kiszáradástűrő és a mérsékelten kiszáradástűrő növények metabolizmusa között.

Újabb kutatásokban a rehidratációs folyamatot vizsgálva hoztak létre 5563 EST klasztert *T. ruralis*ból, amelyből 3321 (59,7 %) mutatott hasonlóságot ismert szekvenciákkal, míg a maradék 2242 ismeretlen. A 30 legnagyobb mennyiségben megjelenő EST közül 10 nem mutat hasonlóságot ismert szekvenciákkal, míg 7 közülük LEA fehérjéket kódoló génekkel mutat hasonlóságot (Oliver és mtsai., 2004).

A jerikói rózsán (*Selaginella lepidophylla*) végzett vizsgálatokban 1046 EST-t írtak le. Ebből 212 (20,2 %) esetében olyan fehérjékkel mutat hasonlóságot a szekvencia a Uniprot/TrEMBL adatbázisában, amelyeknek csak vélt vagy feltételezett a funkciója, de pontosan nem ismert. További 181 (17,3 %) esetben semmilyen hasonlóságot nem találtak, tehát összesen 393 (37,5 %) EST-t azonosítottak, amely új vagy ismeretlen fehérjét kódol. Összehasonlítva a nem kiszáradástűrő *Selaginella moellendorffii* EST szekvenciákkal azt találták, hogy a *S. lepidophylla* szekvenciák 63 %-a egyedi, nincs hasonlóság a *S. moellendorffii*val (Iturriaga és mtsai., 2006).

A gének felfedezésében és funkcionális analízisében a génmutációkat létrehozó és izoláló technikáknak, ezen belül is az *Agrobacterium tumefaciens* segítségével létrehozott inszercióknak és transzgénikus növényeknek jut kiemelten jelentős szerep. Az *Agrobacterium* T-DNS-e (transzfer DNS) a növényi kromoszómák génjeibe integrálódva inszerciós mutációkat okozhat. A T-DNS-sel indukált génmutációk genetikai és molekuláris azonosítása egyszerű, mivel a T-DNS domináns antibiotikum vagy herbicid rezisztenciagénjeinek, illetve ismert DNS szekvenciáinak segítségével az inszerciós mutáció kromoszómális helyzete könnyen megállapítható, illetve a mutáns gén a növényből izolálható.

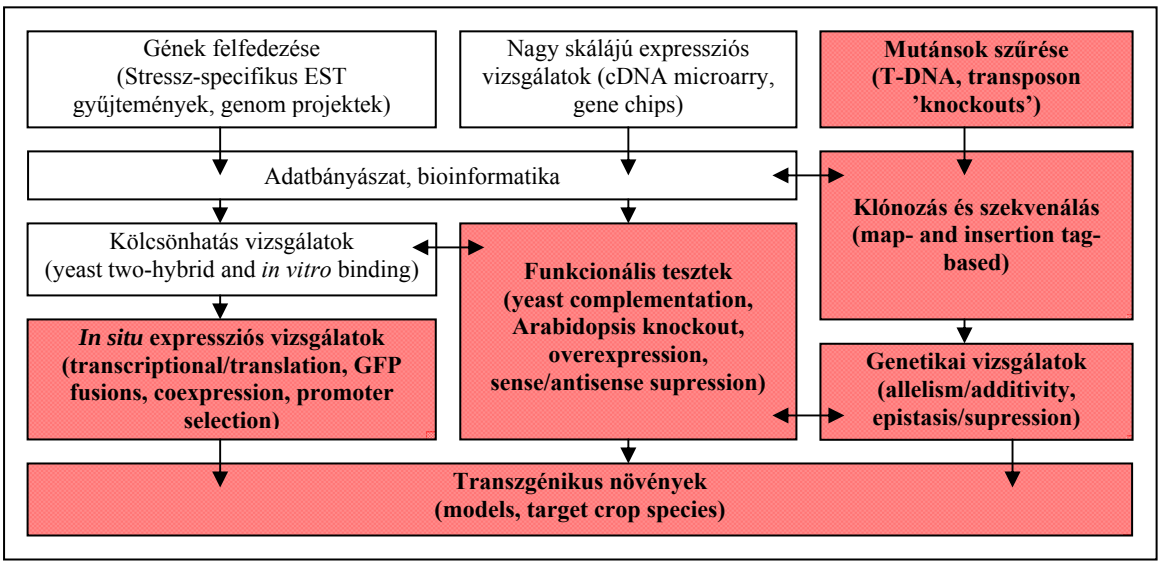
Jelenleg az *Arabidopsis thaliana* reverz genetikai vizsgálatok középpontjában vannak az úgynevezett T-DNS jelölt (T-DNA tagging) mutánsok, amelyekből több mint 250000 vonal áll a kutatók rendelkezésére. Ez a sűrűség azt jelenti, hogy kb. 10 T-DNS beépülés jut 1 génre (Daxinger és mtsai., 2008). Ezt a technikát sikerrel alkalmazzák más esetekben is, mint például növénykórokozó gombák (Meng és mtsai., 2007), vagy rizs (Peng és mtsai., 2005) vizsgálatakor.

A gének szabályozó elemeinek analízisében is segítségünkre lehet a transzgénikus technika, különösen stresszindukálta promóterek vizsgálatánál. Olyan riportergéneket kapcsolhatunk a promóterhez, melynek aktivitása könnyen és érzékenyen mérhető. A konstrukciót bejuttathatjuk növényekbe és ott a stresszhatásokra adott választ a riportergén aktivitásán keresztül tudjuk vizsgálni. Ezzel párhuzamosan konstitutív promótereket alkalmazva túltermeltethetőek a funkcionálisan vizsgálandó gének fehérje termékei. Ezeket a megközelítéseket alkalmazva végezték el *Craterostigma planatgineum, Xerophyta viscosa,*

Boea hygrometrica növényekből származó gének funkcionális analízisét (Deng és mtsai., 2006; Villalobos és mtsai., 2004; Smith-Espinoza és mtsai., 2005, 2007; Kotchoni és mtsai., 2006; Garwe és mtsai., 2006; Liu és mtsai., 2009).

A növénybe épített T-DNS kifejeződésekor tapasztalható az úgynevezett géncsendesítés (gene silencing) jelensége. Lényege, hogy ha egy erős konstitutív promótert használunk a vizsgálni kívánt gén megszólaltatására, akkor a sejtben lévő eredeti gén represszálja a működését, ezt homológia függő géncsendesítésnek (Homology Dependent Gene Silencing, HDGS) hívják. Ez egy új technológia arra, hogy a sejtben lévő eredeti gének működését vizsgálni tudjuk. Az utóbbi időben végzett kutatások eredményeként létrejöttek olyan technikák, amelyek hatékonyan fel tudják használni a géncsendesítés jelenségét a funkcionális analízisben (Cazzonelli és Velten, 2004; 2006). Vírus indukálta géncsendesítést felhasználva vizsgálták földimogyoróban (*Arachis hypogaea*) a *lea4* gének funkcióját (Senthil-Kumar és Udayakumar, 2006).

Az előbb említett módszerek a szensz/antiszensz technikákkal kiegészülve lehetővé teszik genetikai modell rendszereken keresztül, hogy közelebbről megismerjük a kiszáradástűrésben szerepet játszó géneket és molekuláris folyamatokat. Azonban az is egyértelműen látszik, hogy ezek a módszerek egy stabilan, jól működő genetikai transzformációs eljárás nélkül nem alkalmazhatók. A transzformációs eljárások közül kiemelkedő jelentősége van az *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített genetikai módosításnak (8. ábra).



8. ábra A stressztűréssel kapcsolatos gének izolálása és funkcionális analízise. A pirossal kiemelt eljárásokban az *A. tumefaciens* közvetítette genetikai transformáció jelentős szerepet játszik (forrás: Cushman és Bohnert, 2000)

2.1.7. A kiszáradástűrő növények *in vitro* technikái

A kiszáradástűrés kutatásában is, mint a legtöbb kutatásban fontos, hogy a vizsgálatok a lehető legnagyobb kontroll mellett történjenek meg. Ezzel lehet biztosítani, hogy a kapott eredmények valóban a feltett kérdésre adjanak választ, illetve megteremti az ismételhetőség feltételeit. Növények esetében, mivel biológiai rendszerekről van szó, jelenleg a tökéletes kontrollt nem lehet megoldani, de labor (*in vitro*) körülmények között nagyon sok változó környezeti tényezőt szabályozottá lehet tenni, illetve a kísérletezés szempontjából nagyon fontos ismételhetőség megteremthető.

A kiszáradástűrő edényes növényeken eddig döntő többségében olyan leíró jellegű kutatásokat végeztek, amelyek nem igényeltek *in vitro* technikákat. Mára azonban a kiszáradástűrés funkcionális analízise került előtérbe, amit többek között a reverz genetikai megközelítés megjelenése is támogat (Toldi és mtsai., 2006, 2009; Moore és mtsai., 2009). A funkcionális analízis egyik nagyon fontos eleme a geneteikai transzformáció, amit működő növény-sejt-növény rendszer és transzformációs eljárás birtokában, azaz *in vitro* technikák segítségével, lehet alkalmazni.

Az edényes növények közül munkánk kezdetekor a *Craterostigma plantagineum* esetében volt csak egy leírás *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette transzformációs eljárásról. Ezt Furini és munkatársai publikálták 1994-ben. A módszer lényege, hogy a steril körülmények között, MS táptalajon (Murashige és Skoog, 1962) nevelt növényekről 1 cm-nél kisebb explantumokat izoláltak. Az explantumokat szike vagy dörzspapír segítségével sebezték meg, ezt követte a 20 perces *Agrobacterium tumefaciens*sel történő együttenyésztés. A kalluszosítás, majd növényregenerálás MSAR (Koncz és mtsai., 1990) táptalajon történt különböző hormonok és antibiotikumok felhasználásával. Az egyes lépéseket az 1. táblázat tartalmazza. A cikkben leírtak szerint az 1 cm-nél nagyobb explantumok hamar nekrotizáltak, illetve olyan nagy mennyiségben bocsátottak ki magukból fenolszármazékokat, hogy antioxidáns keveréket kellett a táptalajhoz adni. Az antioxidáns keverék 150 mg/l aszkorbinsavat és 100 mgl/l citromsavat tartalmazott. A transzformáció bizonyításához a GUS aktivitást hisztokémiai festéssel mérték, illetve Southern blot analízist használtak. Ezt a módszert használták később a *CDT-1* gén funkcionális analízisében (Furini és mtsai., 1997).

A munkánk kezdetekor a cikkben leírtaknak megfelelően probáltuk meg reprodukálni az eljárást. Sajnos már a kalluszosítás sem sikerült, gyakorlatilag valamennyi explantum 1-2 hét alatt teljes egészében nekrotizálódott és elpusztult. Ezt követően kezdtünk el kifejleszteni

saját módszerünket, amivel hatékonyan lehet mikroszaporítani, szövettenyészteni és transzformálni a *C. plantagineum*ot. A kifejlesztett eljárást 2002-ben publikáltuk (Toldi és mtsai., 2002).

Eljárás	**Táptalaj**	**Idő**	**Fény**
levél explantum fertőzése	MSAR	20 perc	sötét
együtt tenyésztés	MSAR1 (MSAR és + 2.0 mg/l IAA + 0.5 mg/l 2,4-D + 0.2 mg/l kin + 0.2 mg/l 9iP)	2 nap	sötét
kallusz indukció	MSAR + 50 mg/l kanamycin[a] (vagy 15 mg/l hygromycin[a]) + 500 mg/l cefotaxim[b]	10 nap	fény[c]
kallusz fenntartás	ua. mint a kallusz indukció esetében	3 hetente új táptalajra helyezés	fény
hajtás differenciáció	MSAR1a (MSAR és + 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA)	4-5 hét	fény
gyökereztetés	MS	2-3 hét	fény
növény fejlődés	MS	2 hónap	fény
edzés	vizes homok, amely fél mennyiség MS sókat tartalmazott	10-15 nap	fény

1. táblázat. A Craterostigma plantagineum transzformációja során alkalmazott eljárások és táptalajok, az egyes eljárásokhoz szükséges idő és fényviszonyok mellett. (Jelmagyarázat: (a) a kanamycin és hygromycin koncentráció az in vitro tenyésztés alatt változatlan volt ; (b) minden új táptalajra való passzálás után 100 mg/l-el csökkent a koncentrációja ; (c) a fény intenzitása 200 pE/m^2/s volt.)

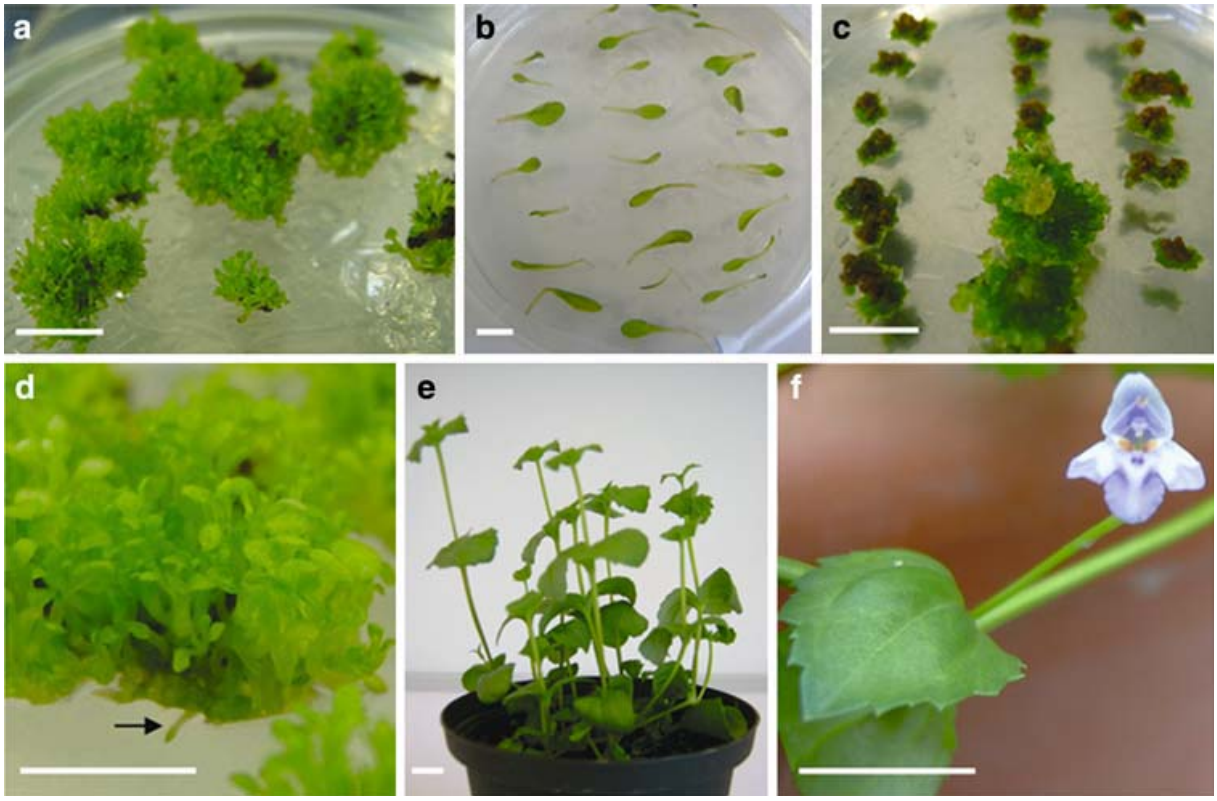
A későbbi kutatásokban felhasználandó másik nönény, a *Ramonda myconi* esetében nem voltak az irodalomban fellelhető adatok sem a mikroszaporításával, sem a szövettenyésztésével vagy a genetikai transzformációjával kapcsolatban. Emiatt a korábban a kutatócsoport által *C. plantagineum* esetében kidolgozott eljárást vettük alapul, amit később többször módosítva sikerült *in vitro* körülmények közé bevonni a *R. myconi*t. A mikroszaporítással és a szövettenyésztéssel kapcsolatos eredményeinket 2004-ben (Tóth és mtsai., 2004), míg a genetikai transzformációval kapcsolatosakat 2006-ban (Tóth és mtsai., 2006) publikáltuk.

A kutatócsoport által végzett munkával párhuzamosan, illetve azt követően három kiszáradástűrő edényes növény *in vitro* módszerét publikálták.

Az egyik a *Haberlea rhodopensis*, amelynek mikroszaporítását és szövettenyésztést Djilianov és munkatársai 2005-ben publikálták. A kísérletekben felhasznált *H. rhodopensis*

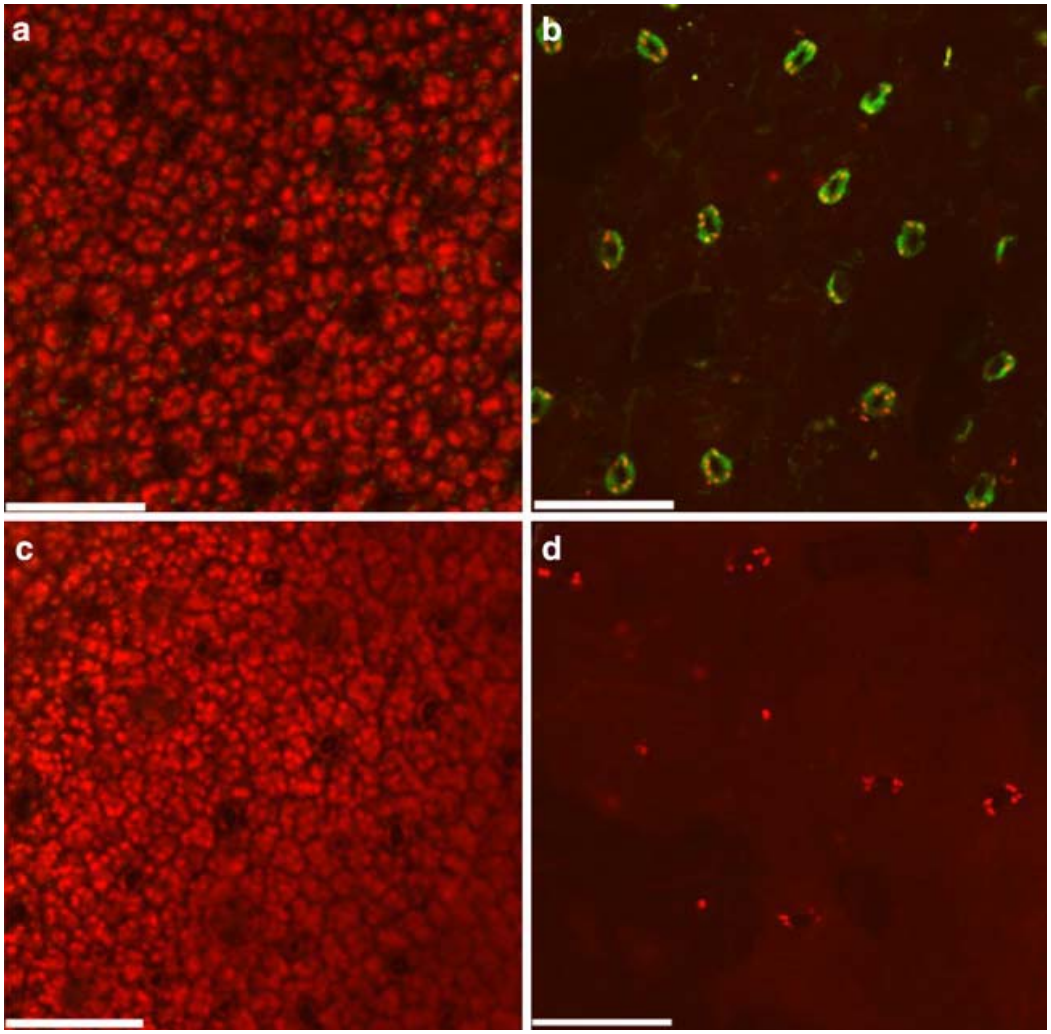
magokat a növény természetes élőhelyéről gyűjtötték. Felszínsterilizálás után MS táptalajon csíráztatták a magokat, de későbbi vizsgálatokban a WPM (Lloyd és mtsai., 1980) táptalaj bizonyult a legjobbnak. A későbbiekben jól fejlett, érett leveleken tesztelték a növényregenerációt. Hormonmentes WPM táptalajon direkt hajtás és gyökér képződést figyeltek meg. A fejlődő növénykék 1,5 hónap alatt elérték az üvegházi körülmények közé való kiültetéshez szükséges fejlettséget. A kísérletek azt valószínűsítik, hogy a WPM táptalaj sikeressége abban rejlik, hogy összsó koncetrációja kb. negyede az MS táptalajnak. A kiszáradástűrő növények tápanyagban nagyon szegény környezetben élnek, ezért feltehetően a tápanyagban gazdag környezet gátolja fejlődésüket.

A másik kiszáradástűrő edényes növény a *Lindernia brevidens*, amelynek *Agrobacterium* közvetítette transzformációs módszerét Smith-Espinoza és munkatársai 2007-ben publikálták (Smith-Espinoza és mtsai, 2007). A kísérletekben MS táptalajt használtak, azonban gyökér regenrációhoz megfelezték az MS táptalaj sótartalmát. A kallusz fázist kihagyva, a levélexplantumokon direkt renerációval indukáltak új növényeket (9. ábra).



9. ábra Az *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette genetikai transzformáció lépései *Lindernia brevidens* esetében. (a) *In vitro* levélexplantumokon fejlődő növénykék. (b) *A. tumefaciens* együttenyésztés. (c) Hygromycin alapú szelekció és hajtásregenráció. (d) Korai gyökeresedés, a nyíl mutatja a gyökérszerkezetet. (e) Transzgénikus növény kiültetése talajba. (f) A virágzó *L. brevidens*. Jelmagyarázat: a fehér csík 1 cm-t jelent. (Forrás: Smith-Espinoza és mtsai, 2007)

A genetikai transzformációs eljárásban eGFP (enhanced green fluorescent protein; Cormack és mtsai., 1996) kódoló gent használtak. A transzformáció bizonyítása többek között konfokális lézer mikroszkóp (confocal laser scanning microscopy) segítségével történt meg (10. ábra).



10. ábra *eGFP* expresszió a transzgénikus *Lindernia brevidens* Lb2745proGFP vonalának kiszáradt szöveteiben. (a) A hidratált levelekben alig mutatható ki *eGFP* expresszió. (b) A kiszáradást követően a sztóma záró sejtekben vol megfigyelhető a *eGFP* expresszió. (c) és (d) A vad típusú növényekben sem hidratált, sem kiszáradt állapotban nem volt megfigyelhető *eGFP* expresszió. Jelmagyarázat: a fehér csík 50 µm. (Forrás: Smith-Espinoza és mtsai, 2007)

A harmadik növény a *Ramonda serbica*, amelyet Sabovljevic és munkatársainak 2008-ban sikerült szövettenyészteni, mikroszaporítani. Továbbá sikerült protoplasztokat izolálni és GFP konstrukcióval (Esch és mtsai., 2003), PEG segítségével transzformálni.

2.2. Az *Agrobacterium tumefaciens*-re alapozott genetikai transzformációs módszer

2.2.1. Az *Agrobacterium* törzsek, mint növényi kórokozók

A *Rhizobiaceae* családba tartozó agrobaktériumok talajlakó, növénypatogén baktériumok. Az *Agrobacterium* alcsaládba több, mezőgazdasági szempontból is fontos faj tartozik. Az *Agrobacterium rhizogenes* hajszálgyökerűséget okoz, az *A. tumefaciens*, az *A. rubi* és az *A. vitis* tumorokat okoz a növények szárán. Az utóbbi faj a szőlőt betegíti meg, míg a többi viszonylag széles gazdakörrel rendelkezik. A természetben előforduló *Agrobacterium* fajok közül nem mindegyik patogén azaz avirulens, mert hiányzik belőlük a patogenitásért felelős géneket hordozó úgynevezett tumorindukáló (Ti) vagy hajszálgyökerűséget indukáló (Ri) plazmid.

Fridiano Cavara (1897) volt az első, aki azonosította az *A. vitist*, mint a szőlő tumorképződéséért felelős kórokozóját (2. táblázat). Tíz évvel később leírják az *A. tumefaciens* tumorindukáló hatását a margitvirágon (Smith és Townsend, 1907), ma pedig már ismerjük a C58-as törzs teljes genomját (Goodner és mtsai., 2001).

Év	Felfedezés	Hivatkozás
1853	Az első írásos beszámoló a növényeken képződő tumorokról.	Fabre és Dunal
1897	Azonosították az *A. vitis*-t, mint a szőlő tumorképző kórokozóját.	Cavara
1907	Azonosították az *A. tumefaciens*-t, mint a margitvirág tumorképző kórokozóját.	Smith és Townsend
1947	Steril tumor szövetet tudtak hormonmentes táptalajon korlátlan ideig növeszteni. Úgy gondolták, hogy a tumor sejteket az *Agrobacterium*-ból származó tumor indukáló részecske (TIP, tumor-inducing principle) alakította át.	Braun
1956	Kizárólag a tumorszövetben található, kis molekulasúlyú (opinok) vegyületeket azonosítottak.	Lioret
1971	Az *A. tumefaciens* 37 C°-on elveszti virulenciáját. A TIP képes átjutni a virulens és avirulens törzsek között.	Hamilton és Fall Kerr
1974	Az *A. tumefaciens* virulencia a Ti plazmid jelenlététől függ. A TIP valószínűleg része a Ti plazmidnak.	Zaenen és mtsai.
1977	A Ti plazmid T-DNS-e jelen van a tumor sejtek genomjában: a T-DNS a TIP.	Chilton és mtsai.
1980	Az opin elmélet: a transzformált sejtek által termelt opin biztosítja a túlélést az *Agrobacterium*nak.	Guyon és mtsai.
1983	Az első *A. tumefaciens* közvetítette genetikai transzformációval előállított növény.	Zambryski és mtsai.
1984	Az auxin és citokinin túltermelésért felelős onkogéneket azonosítják.	Klee és mtsai.
1985	A *virA/virG* két-komponensű jelátviteli rendszer azonosítása.	Stachel és Zambryski
1986-	Pontosabban megismerték a *vir* gének kódolta T-DNS transzfert, kiterjesztették az *A. tumefaciens* gazdakörét az egyszikűekre is, megszekvenálták az *A. tumefaciens* C58-as törzsének a teljes genomját.	Zupan és mtsai. Gelvin Tzfira és Citovsky

2. táblázat. Fontosabb állomások az *Agrobacterium* biológiájának felderítésében (Forrás: Escobar és Dandekar, 2003)

2.2.2. Génátvitel az *Agrobacterium*-ból a gazdanövénybe

Természetes körülmények között az *A. tumefaciens* fertőzésének első fázisában a növények sérülésekor kibocsátott cukrokat, aminósavakat és másodlagos növényi anyagcseretermékeket – pl. a lignin bontásából származó fenolszármazékokat –, mint kémiai szignálokat ismerik fel a baktériumok és azok felé kezdenek el mozogni (Shaw, 1991). A sérült szövethez vándorolva megkezdik inváziójukat: a sejtfalhoz tapadnak, sejtaggregátumokat képeznek, majd cellulóz fonalakat szintetizálva stabilan megkötődnek a sejtek felszínén (Binns és Thomashow, 1988). A gazdanövény sejtfelszíneihez kötődésért számos kromoszómális gén felelős. Ezek közül a *chvA, chvB* és *pscA* gének a sejtfelszíni poliszacharidok szintézisében résztvevő enzimeket kódolnak. Ezen gének mutáns változatait hordozó *Agrobacterium* törzsek nem képesek stabilan a növényi sejtfalhoz tapadni, rezisztensek bizonyos fágokkal szemben, nem rendelkeznek a mozgást biztosító flagellumokkal és így kevésbé virulensek.

A kromoszómális gének mellett a fertőzésben legfontosabb szerepet a baktérium tumorindukáló (Ti) plazmidján kódolt gének játszák. A Ti plazmid úgynevezett virulencia régiójában azonosították a gazdaspecificitást és a tumor kialakulását kódoló *vir* géneket.

A növényi szignálok érzékelésében és ennek továbbításában a *virA* gén alapvető jelentőségű (Stachel és Zambryski, 1985). A *virA* gén egy úgynevezett membránkötött kémiai receptort kódol, amelynek N-terminális periplazmás és C-terminális citoplazmás régióit egy periplazmás hurkon keresztül két membránba ágyazott hidrofób peptid kapcsolja össze. Az N-terminális periplazmás régió a cukrok és pH érzékelésében, míg a VirA hidrofób transzmembrán régiói közötti periplazmás hurok a fenolszármazékok detektálásában játszik szerepet. Cukor- és fenolvegyületek hatására vagy pH változások eredményeként, a VirA fehérje konformációja megváltozik. Ez a konformációváltozás a C-terminális régióban található egyik hisztidin autofoszforilációjához vezet. A foszforilált VirA fehérje specifikus kölcsönhatásba lép egy transzkripciós faktorral, amit a Ti plazmid *virG* génje kódol. A VirA fehérje emellett képes aktiválni a CheA protein kinázt, amely a Trg membránfehérje metilációjának szabályozása által regulálja a kemotaxishoz szükséges *mot* (motor) és *fla* (flagellum) géneket. A VirA funkción keresztül a kemotaxis gének aktiválódnak alacsony koncentrációjú növényi fenolok jelenlétében. A fenolvegyületek megemelkedett koncentrációja indukálja a VirA foszforilációját, és ezáltal gátolja a CheA funkción keresztül a kemotaxis gének további aktiválódását. Amint azt a fenti példa is mutatja, a fenolszármazékok a VirA kináz legjobb indukálói. A dohányban azonosított acetosziringon

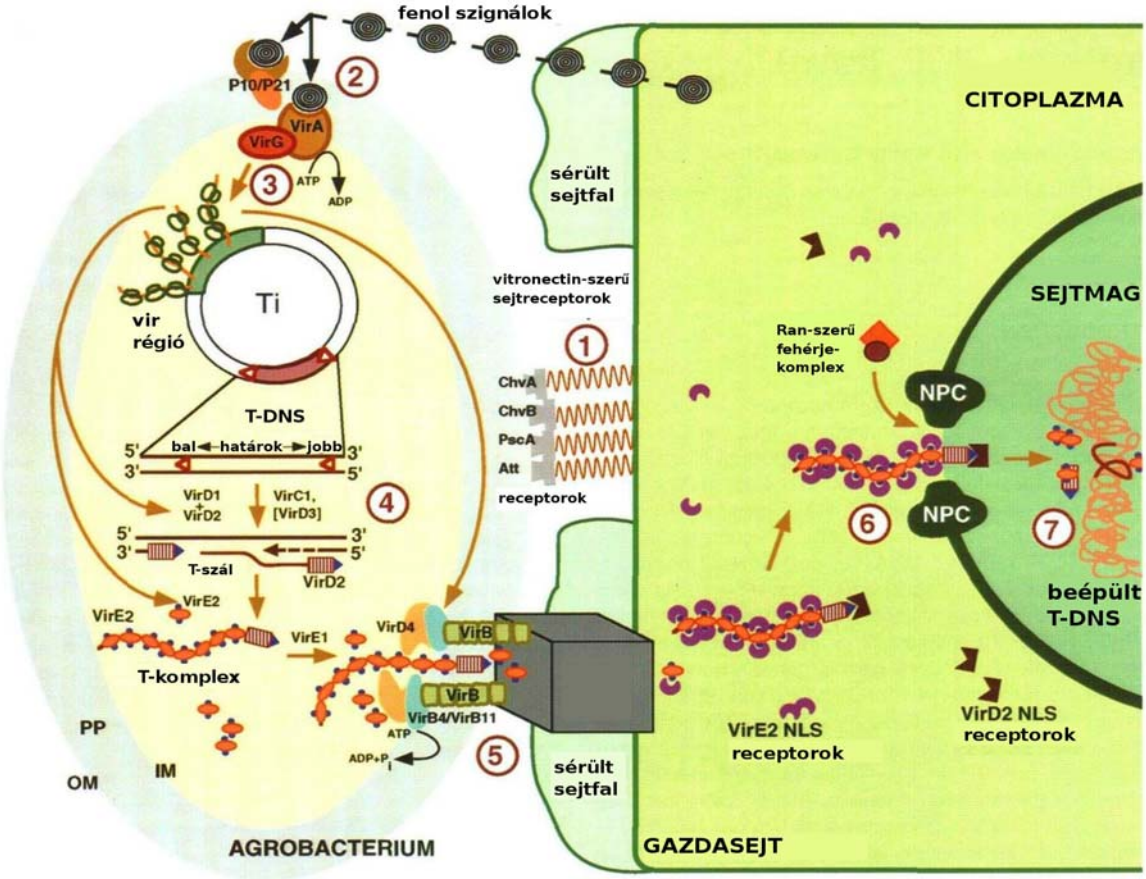
(AS) és hidroxiacetosziringon (HAS) mellett, az acetofenolok, monoligninek, fahéjsav, kávésav származékok is hatásos VirA aktiválók. Más fenolvegyületek azonban – pl. a DIMBOA a kukoricában – effektív VirA gátlóként működnek, ami lehetséges magyarázata lehet annak, hogy csak kevés egyszikű szolgál *Agrobacterium* gazdaként (Koncz és Rédei, 2001).

A környezeti faktorokkal szembeni érzékenységet a VirA által foszforilált VirG fehérje is szabályozza. A VirG protein a LysR típusú bakteriális transzkripciós faktorok családjába tartozik, melyek aktivitását a VirG-hez hasonlóan a kétkomponensű bakteriális szignálátviteli utak érzékelő/szabályozó proteinkinázai foszforilációval szabályoznak. A foszforilálás konformációváltozást okozva stimulálja a VirG fehérje DNS-kötő aktivitását. A *virA* gén kivételével az aktivált VirG protein specifikusan kötődik a Ti plazmid virulenciarégiójában található gének/operonok promótereinek *vir* regulátor (úgynevezett *vir*-box) szekvenciáihoz és aktiválja e gének/operonok transzkripcióját. Így a VirG fehérje saját génjének expresszióját is szabályozza (Koncz és Rédei, 2001).

A Ti plazmidon sikerült azonosítani egy T-régiónak nevezett szakaszt is, amely a tumor fenotípusát (pl. kompakt tumor, illetve hajtás- és gyökérindukáló tumor) meghatározó géneket is kódol. DNS hibridizációval kimutatták, hogy az *Agrobacterium*-ok által okozott növényi tumorok a Ti plazmidok T-régióival kolineáris DNS szekvenciákat hordoznak kromoszómális DNS-ükbe integrálva, amelyekről a növényi sejtekben mRNS szintetizálódik (Chilton és mtsai., 1977). Röviddel ezután, a T-régióban DNS szekvenálással azonosított génekről *E. coli*-ban fehérjéket szintetizáltak, majd a fehérjék ellen készült ellenanyagokkal kimutatták, hogy a T-régiókkal komplementer mRNS-ekről fehérjék szintetizálódnak a tumorsejtekben. A T-régió génjeinek vizsgálata azt is kimutatta, hogy a T-régióról nem, vagy csak igen kevés RNS és fehérje szintetizálódik *Agrobacterium*-ban. Ezek az eredmények azt jelezték, hogy az *Agrobacterium* Ti plazmid T-régióján lévő gének a fertőzés során a növényi sejtekbe transzferálódnak, ahol stabilan beépülnek a növény sejtmagi DNS-ébe (11. ábra). A virulencia génekkel elvégzett hasonló vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy a *vir* gének nem jutnak át a növényi sejtekbe.

A T-DNS gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyek a növényi növekedési hormonok – auxinok és citokininek – termeléséért felelősek, illetve azok szintézisét vagy aktivitását szabályozzák (Klee és mtsai., 1984). Ez magyarázhatja, hogy miért lehetett a növényekről eltávolított tumorok szöveteit hormonmentes táptalajokon korlátlan ideig szaporítani (Braun, 1947). Emellett a T-DNS génjei sajátos cukor és aminósav-származékok szintéziséért felelős fehérjéket is kódolnak. Ezek, a csak *Agrobacterium*-ok által transzformált növényszövetekben

megtalálható vegyületek (opinok), a növényi sejtekből exportálódnak és az *Agrobacterium*-ok számára szén- és nitrogénforrásként szolgálnak. Emellett, egyes opinok (pl. oktopin, agrocinopin) kémiai szignálként is szolgálnak és indukálják az *Agrobacterium* Ti plazmidok konjugációját. Ezt a jelenséget foglalja össze az opinelmélet (Guyon és mtsai., 1980), amely szerint az *Agrobacterium* képes a gazdanövény hormonális és biokémiai tulajdonságait a T-DNS transzformáció segítségével megváltoztatni úgy, hogy a megváltoztatott tulajdonságú növényi sejtek az *Agrobacterium* invázió folyamatát fenntartják a virulenciáért felelős Ti plazmidok átvitelét indukáló és az *Agrobacterium*-ok táplálékául szolgáló vegyületek szintézisével. A különböző *Agrobacterium* törzsek T-DNS-ei különböző opinok szintéziséért felelős géneket kódolnak. Ezért a különböző *Agrobacterium* törzsek által transzformált növényi szövetekben termelődő opinok alapján a Ti plazmidok különböző családokba sorolhatók (oktopin, nopalin, agropin, mannopin, vitopin, stb.).



11. ábra Az *Agrobacterium tumefaciens* ferőzés folyamata: 1, kötődés a gazdasejt felszíneihez; 2, a szignál molekulák felismerése VirA/VirG érzékelő-továbbító rendszer által; 3, a *vir* gének aktiválódása; 4, a transzferálható T-szál szintézise; 5, a T-komplex kialakítása és a növényi gazdasejtbe juttatása; 6, a T-komplex bejutása a sejtmagba; 7, T-DNS integráció a növényi sejt kromoszómájába (Forrás: Sheng és Citovsky, 1996)

A T-DNS-ről szintetizálódó úgynevezett T-szál képződésében és a növényi sejtekbe való átjuttatásában számos virulencia gén vesz részt. A T-DNS határszekvenciáit felismerő fehérjéket a *virD1, virD2* és *virC1* gének kódolják. A T-szál szintézise a jobboldali 25 bázispárnyi határszekvencia alsó DNS szálának hasításával kezdődik, amely után a pilóta VirD2 fehérje és a T-szál 5'-vége között kovalens kötés jön létre (Zambryski, 1992) (11. ábra). A T-szálat letekerő szálpótló DNS szintézis a jobboldali határszekvenciáktól halad a baloldali felé. A DNS szintézist a baloldali határszekvenciát hasító és ott a DNS 5'-végéhez kapcsolódó VirD2 molekula terminálja, amely az újonnan szintetizált DNS szál 3'-végét a baloldali határszekvencia 5'-végével összeköti. A Ti plazmidról való letekeredés során a T-szál a VirE2 egyszálú DNS kötő fehérjével lép kapcsolatba. A VirE2 fehérje kooperatív módon kötődik a T-szálhoz, azt teljes hosszában beborítja, levédve annak 3'-végét is. Ezzel a T-szál nem csak védettséget kap a nukleázokkal szemben, de a pórusokon átvihető, fonálszerű nukleoprotein-komplex szerkezetét is elnyeri. E komplex 5'-végét védő VirD2 fehérje kölcsönhatásba tud lépni a T-szál transzportját biztosító membránpólusokkal, melyeket a VirB fehérjék képeznek. A *virB* operon 11 génje által kódolt fehérjék közül 9 hidrofób, a baktérium belső és a külső membránjában található (11. ábra). A T-szál növényi sejtekben való viselkedéséről és a kromoszómába integrálódásáról jelenleg kevés az ismeretünk (Zambryski, 1992).

2.2.3. Az *Agrobacterium* fajok felhasználása növénygenetikai transzformációs vektorként

Számos kutatóban felmerült az ötlet, hogy a fentebb leírt természetes folyamatot fel lehetne használni idegen gének bejuttatására növényekbe. A Ti plazmid T-DNS-én azonosított gének mutációs vizsgálata kiderítette, hogy egyetlen T-DNS által kódolt gén funkciója sem szükséges a T-DNS transzportjához a növénybe (Leemans és mtsai., 1982; Zambryski és mtsai., 1983; Hille és mtsai., 1983). A T-DNS határszekvenciái között található gének közül egyedül az oktopin vagy nopalin szintáz gént megtartva, olyan termékeny és normális fejlődést mutató transzgénikus növényeket lehetett előállítani, amelyek utódai a T-DNS által kódolt oktopin vagy nopalinszintáz géneket hordozták, stabilan expresszálták és örökítették.

Ez a felfedezés hatalmas távlatokat nyitott a kutatók előtt. A növényekbe való idegen gén bejuttatásának kezdeti eljárásai azonban olyan összetettek voltak, hogy csak néhány kifejezetten erre szakosodott laboratóriumban jártak sikerrel. Ezért számos alternatív

megoldást dolgoztak ki, amelyek már lehetővé tették, hogy a nem kimondottan molekuláris szakemberek is egyszerűen alkalmazni tudják az *Agrobacterium*-okat, mint genetikai transzformációs vektorokat. Ilyen eljárás a bináris T-DNS vektorokkal történő génbevitel (Hoekema és mtsai., 1983; Framond és mtsai., 1983). Molekuláris vizsgálatok kiderítették, hogy a T-DNS határszekvenciái a Ti plazmidból eltávolíthatók és bármely, *Agrobacterium*-ban replikálódni képes plazmidba beépíthetők funkciójuk megváltoztatása nélkül. Így kimutatták, hogy a két T-DNS határszekvencia közé épített bármely DNS szekvencia átvihető növénybe, ha a Ti plazmid virulencia génjei úgynevezett *transz* helyzetben jelen vannak az *Agrobacterium*-ban. A virulencia régió és a T-DNS határszekvenciák fizikai elkülönítése lehetővé tette olyan mesterséges T-DNS-ek elkészítését, amelyeket kis méretű és könnyen kezelhető plazmidok hordoztak. Azt a rendszert, ahol a virulencia régió és a T-DNS külön-külön plazmidon található kételemű vagy bináris transzformációs rendszernek nevezik. A T-DNS nélküli, de *vir* géneket hordozó *Ti* plazmidot segítő (helper) plazmidnak hívják. A T-DNS-t tartalmazó plazmidot „bináris" vektornak nevezik, amelyet *E. coli*-ban való klónozásra és transzformációra használnak. A bináris vektorokra Koncz és Rédei (2001) szerint jellemző, hogy:

1. A vektor egy olyan replikációs origót hordoz, amely *E. coli*-ban és *Agrobacterium*-ban egyaránt működik.
2. A vektor tartalmaz egy olyan szelektálható (vagy azonosítható) gént, melynek fenotípusa (pl. antibiotikum rezisztencia) alapján a vektort hordozó *E. coli* és *Agrobacterium* sejtek szelektálhatók.
3. A vektor *Agrobacterium*-ba juttatásához ajánlott, hogy a vektor hordozzon egy nagy gyakoriságú, baktériumok közötti konjugációt biztosító *oriT* szekvenciát.
4. A vektor T-DNS régióját két T-DNS határszekvencia határolja.
5. A vektor T-DNS-én belül egy növényben szelektálható riportergén (növényi szelektálható markergén) található, amely az *Agrobacterium*-mal transzformált növényi sejtek szelekcióját és felszaporítását lehetővé teszi.
6. A T-DNS-en belül alkalmas restrikciós endonukleáz felismerő helyek állnak rendelkezésre további gének beépítésére.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Felszínsterilizálás

3.1.1. A *Craterostigma plantagineum* előkészítése *in vitro* kultúrához

A kísérletek kiindulási alapanyagául szolgáló *C. plantagineum* növényeket Prof. Dr. Dorathea Bartels bocsátotta rendelkezésünkre (Németország, Köln, Max Plank Institute), aki eredetileg Namibiában gyűjtötte azokat. A növényeket 10 cm átmérőjű virágcserepekben neveltük és a keletkező új oldalhajtásokat levágva folyamatosan továbbszaporítottuk. A növények 6 hónapos korukra érték el az *in vitro* tenyésztéshez szükséges fejlettségi állapotot. Ekkor a fiatal és egészséges leveleket levágtuk az anyanövényekről, 70 %-os (v/v) ethanollal lemostuk őket majd 5 percig 30 %-os (v/v) Domestosban (Unilever Kft., Budapest) kevertetve felszínsterilizáltuk. A fertőtlenítőszer-maradványokat többszöri steril vizes mosással távolítottuk el.

3.1.2. A *Ramonda myconi* előkészítése *in vitro* kultúrához

A kísérletekhez használt *R. myconi* terméseket dísznövénykertészetből szereztük be Angliából. Az érett magokat 70 %-os (v/v) ethanolban 1 percig, ezt követően 30 %-os (v/v) Domestos oldatban 30 percig kevertetve felszínsterilizáltuk. A Domestos oldathoz minden esetben adtunk néhány csepp Triton X-100 felszínnedvesítő detergenst. A fertőtlenítőszer-maradványokat többszöri steril vizes mosással távolítottuk el. A felszínsterilizált magokat cukor- és hormonmentes (Toldi és mtsai., 1994), 50 % makro- és mikroelem, valamint 10 mg/l thiamine tartalmú MS táptalajon (Murashige és Skoog, 1962) csíráztattuk, amelyhez autoklávozás után 0,1 mg/l filter sterilizált GA_3-at adtunk. A pH-t 1 M-os KOH-dal 5,8-as értékre állítottuk be. A táptalajt műanyag Petri csészékbe öntöttük és Petri csészénként 15 magot helyeztünk el. A csíráztatást 23±1 ºC-on, 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódus alkalmazásával végeztük.

3.2. Növényanyag

3.2.1. A *Craterostigma plantagineum* mikroszaporítása

A felszínsterilizált leveleket hormonmentes táptalajt tartalmazó műanyag konténerekbe (Duchefa Biochemie) helyeztük, amelyeket fényszobában 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódus mellett 23±1 ºC-on tartottuk. A mikroszaporító táptalaj (CMS táptalaj) MS makro- és mikroelemeket (Murashige és Skoog, 1962), 100 mg/l mezo-inozitot, 1mg/l thiamint, 0,5 mg/l nikotinsavat, 0,5 mg/l piridoxint, 30 g/l szacharózt és 8 g/l agart tartalmazott. A pH-t 5,8-ra állítottuk be autoklávozás előtt 1 M-os KOH használatával. A 20 percig tartó autoklávozás után 1 liter táptalajhoz 10 ml K-foszfát pufferben (3,81 ml 1 M-os K_2HPO_4 és 6,19 ml 1 M-os KH_2PO_4) oldott 200 mg glutationt adtunk steril szűréssel, amikor a táptalaj kb. 60-65 °C hőmérsékletűre hűlt.

Három hét elteltével jól fejlett gyökerű növények differenciálódtak a leveleken. Ezeket leválasztottuk a levelekről majd műanyag konténerbe helyeztük és 3-4 hetente passzáltuk őket.

3.2.2. A *Ramonda myconi* mikroszaporítása

A magokból fejlődő aszeptikus csíranövények képezték a kísérletek kiindulási anyagát, melyek steril fenntartása és szaporítása volt a következő feladat. A növényanyagból azokat az egyedeket választottuk ki mikroszaporításra, amelyeknek gyökérzete, levelei épek, egészségesek, a levelek szélei nem barnultak, gyorsan növekedtek és nekrotikus foltoktól mentesek voltak. Az előző szempontok alapján elkülönített egyedeket mikroszaporító táptalajra (RA táptalaj) helyeztük. A 8 g/l agarral szilárdított táptalaj a 40 %-os MS makro- és mikroelemek valamint a 100 %-os MS vitaminok mellett literenként 30 g szacharózt tartalmazott. A pH-t 5,8-as értéken stabilizáltuk 1 M-os KOH-val. A kb. 20 percig tartó autoklávozás után K-foszfát pufferben oldott 200 mg/l glutationt adtunk a táptalajhoz steril szűréssel, melyet Vitro Vent konténerekbe (Duchefa) öntöttük ki. A kiindulási növényanyagot 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódus mellett 24±2 ºC-on tartottuk. A növényeket 3-4 hetente passzáltuk. Az elöregedett, elhalt részeket a passzálás során eltávolítottuk.

3.3. Növényregenerációs módszerek kifejlesztése

Mindkét növény esetében kísérleteink egyik célja egy olyan módszer kifejlesztése volt, amelynek eredménye egy jól működő növény-sejt-növény rendszer. Ennek érdekében számos paraméter optimalizálását végeztük el, amelyeknek bemutatása az Eredmények fejezetben történik. Jelen pontban csak a kísérleteink eredményeként kapott, optimalizált módszert ismertetem.

3.3.1. *Craterostigma plantagineum* növények kalluszosítása és regenerációja

A gyorsan fejlődő, egészséges mikroszaporított növényekről származó levelekből kb. 5x7 mm nagyságú explantumokat vágtunk ki úgy, hogy a levélszegmensnek legalább három vágott éle legyen. Ezeket az explantumokat olyan kallusz indukciós táptalajra (CI, kallusz indukáló táptalaj) helyeztük, amely MS makro- és mikroelemeket, 100 mg/l mezo-inozitot, 1 mg/l thiamint, 0,5 mg/l nikotinsavat, 0,5 mg/l piridoxint, 30 g/l szacharózt, 0,2 mg/l 6-benzilaminopurint (BAP), 2 mg/l picloramot és 3,5 g/l gelrite-ot tartalmazott. A pH-t 5,8-ra állítottuk be 1 M-os KOH használatával autoklávozás előtt. A 20 percig tartó autoklávozás után 1 liter táptalajhoz 10 ml K-foszfát pufferben (3,81 ml 1 M-os K_2HPO_4 és 6,19 ml 1 M-os KH_2PO_4) oldott 200 mg glutationt adtunk steril szűréssel, amikor a táptalaj kb. 60-65 °C hőmérsékletűre hűlt. A Petri csészéket fényszobába helyeztük, 16 h fény (kb. 1000 lx) / 8 h sötét fotoperiódus mellett 23±1 ºC-on inkubáltuk. Az explantumokat a fejlődő kallusszal együtt 2 hetente passzáltuk.

A növényregeneráláshoz a fejlődött kalluszokat regenerációs táptalajra (NR, növény regeneráló táptalaj) helyeztük a 4-6. héten, amely MS makro- és mikroelemeket, 100 mg/l mezo-inozitot, 1 mg/l thiamint, 0,5 mg/l nikotinsavat, 0,5 mg/l piridoxint, 30 g/l szacharózt, 0,2 mg/l 6-benzilaminopurint (BAP), 0,15 mg/l indol-3-ecetsavat (IAA) és 8 g/l agart tartalmazott. A pH-t 5,8-ra állítottuk be 1 M-os KOH használatával autoklávozás előtt. A 20 percig tartó autoklávozás után 1 liter táptalajhoz 10 ml K-foszfát pufferben (3,81 ml 1 M-os K_2HPO_4 és 6,19 ml 1 M-os KH_2PO_4) oldott 200 mg glutationt adtunk steril szűréssel, amikor a táptalaj kb. 60-65 °C hőmérsékletűre hűlt. A Petri csészéket fényszobába helyeztük 16 h fény (kb. 4500 lx) / 8 h sötét fotoperiódus mellett 23±1 ºC-ra. A kalluszok felszínén kb. 1 hónap elteltével hajtások jelentek meg, amelyekből egészséges növények fejlődtek.

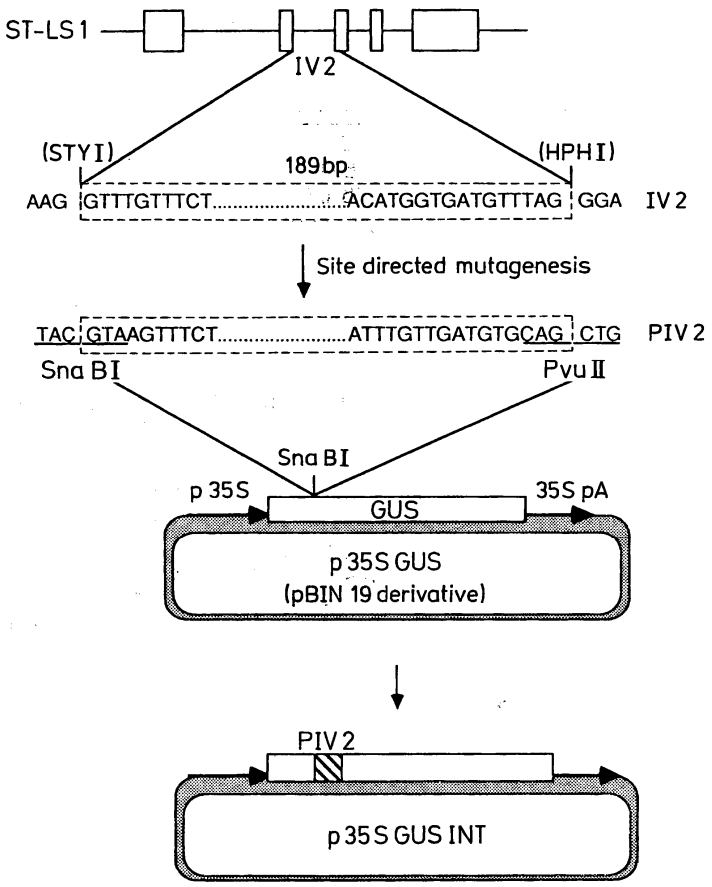
3.3.2. *Ramonda myconi* növények kalluszosítása és regenerációja

A kalluszosítási kísérletek beindításához a kiindulási alapanyagból középkorú egészséges leveleket válogattunk, amelyekből 4x6 mm nagyságú szegmenseket vágtunk ki. Ezeket az explantumokat olyan kalluszindukciós táptalajra helyeztük, amely 40 % MS makro- és mikroelemeket, 100 % MS vitaminokat, 100 mg/l mezo-inozitot, 30 g/l szacharózt, 0,2 mg/l 6-benzilaminopurint (BAP), 2 mg/l picloramot és 8 g/l agart tartalmazott. A pH-t 5,8-ra állítottuk be 1 M-os KOH használatával autoklávozás előtt. A 20 percig tartó autoklávozás után 1 liter táptalajhoz 10 ml K-foszfát pufferben (3,81 ml 1 M-os K_2HPO_4 és 6,19 ml 1 M-os KH_2PO_4) oldott 200 mg glutationt adtunk steril szűréssel, amikor a táptalaj kb. 60-65 °C hőmérsékletűre hűlt. A Petri csészéket fényszobába helyeztük 16 h fény (kb. 1000 lx) / 8 h sötét fotoperiódus mellett 24 ºC-ra.

A növényregenerálás során a fejlődő kalluszt nem távolítottuk el a levélkorongokról, hanem azokkal együtt 10 cm átmérőjű üveg Petri csészékbe (6 db / Petri csésze) helyeztük regeneráló táptalajra. A regeneráló táptalaj 40 % MS makro- és mikroelemeket, 100 % MS vitaminokat, 100 mg/l mezo-inozitot, 30 g/l szacharózt, 0,2 mg/l 6-benzilaminopurint (BAP), 1-2 mg/l α-naftilecetsavat (NAA) és 8 g/l agart tartalmazott. A pH-t 5,8-ra állítottuk be 1 M-os KOH használatával autoklávozás előtt. A 20 percig tartó autoklávozás után 1 liter táptalajhoz 10 ml K-foszfát pufferben (3,81 ml 1 M-os K_2HPO_4 és 6,19 ml 1 M-os KH_2PO_4) oldott 200 mg glutationt adtunk steril szűréssel, amikor a táptalaj kb. 60-65 °C-ra hűlt. A Petri csészéket fényszobába helyeztük 16 h fény (kb. 4500 lx) / 8 h sötét fotoperiódus mellett 24 ºC-ra. A kalluszok felszínén kb. 3-4 hét elteltével hajtások jelentek meg, amelyekből egészséges növények fejlődtek.

3.4. *Agrobacterium* törzs

A genetikai transzformációhoz használt *Agrobacterium tumefaciens* GV2260-as (Deblaere és mtsai., 1985) törzset, amely a p35S::GUSINT bináris vektort (Vancanneyt és mtsai., 1990) tartalmazta Dr. Reiner Höefgen (Németország, Glom, Max Planck Institute Molecular Plant Physiology) bocsátotta rendelkezésünkre. A p35S::GUSINT transzformációs kazettája tartalmazta a ß-glükoronidáz (*gus*) kódoló régiót, amelybe a burgonya *st-ls1* génjének második intronát építették be (12. ábra). Ez a beépített intron biztosította, hogy a *gus* gén csak a növényekben fejeződjön ki.



12. ábra Intron klónozása a β-glükoronidáz (*gus*) génbe. A kép felső része mutatja az *st-ls1* gén sematikus ábráját. A téglalapok az exonokat, míg a vonalak az intronokat jelölik. A p35SGUS plazmidba a mutációs kezeléssel előállított PIV2 intron került beépítésre. (Forrás: Vanncaneyt, 1990)

3.5. Genetikai transzformáció

A növényregenerációs módszerek kidolgozását követően kísérleteink másik célja jól működő genetikai transzformációs rendszer létrehozása mindkét modellnövényünk esetében. Ennek érdekében számos paraméter optimalizálását végeztük el, amelyeknek bemutatása – hasonlóan a 3.4-es fejezethez – az Eredmények fejezetben történik. Jelen pontban csak a kísérleteink eredményeként kapott, optimalizált módszert ismertetem.

3.5.1. Az *Agrobacterium* előkészítése és együttenyésztése

Mindkét növény esetében a transzformációhoz használt *Agrobacterium* törzs előkészítése és az együttenyésztés első fázisa azonos körülmények között történt az alább ismertetett módon:

Az *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformációhoz a Hiei és mtsai. (1997) által publikált módszer továbbfejlesztett változatát használtuk. A –80 ˚C-on glicerin kultúrában tárolt baktériumokból a transzformáció előtt 2-3 nappal 25 mg/l kanamycint és 100 mg/l rifampicint tartalmazó szilárd YEB táptalajon tenyészeteket indítottunk. A felnövő telepekből steril oltókaccsal nagyobb mennyiségű baktériumot helyeztünk át 250 ml-es Erlenmeyer üvegekbe, amelyek 50 ml folyékony infekciós CPY táptalajt (1 g/l élesztőkivonat, 5 g/l tripton, 5 g/l szacharózt, 500 mg/l $MgSO_4X7H_2O$, 2 g/l MES, 25 mg/l kanamycin, 100 mg/l rifampicin, pH 5,6) tartalmaztak. A baktérium kultúrát egy éjszakán át rázattuk (200 rpm) 28 ˚C-on. Amikor a kultúrák elérték a spektrofotométerrel mért OD_{550}=0,6-0,8 (~10^8 baktériumsejt/ml) értéket, centrifugálással ülepítettük a sejteket (10 perc 8000 rpm). A pelletet újraszuszpendáltuk 40 ml folyékony infekciós MS táptalajba, amely 1/3 sókoncentrációjú MS makro- és mikroelemeket, 10 mg/l thiamint, 1 g/l kazein hidrolizátumot, 10 g/l glükózt és 50 µM acetosziringont (AS) tartalmazott. A pH-t 5,0-re állítottuk. A bakteriumos fertőzés létrejöttéhez a transzformálandó explantumokat egy steril Petri csészébe gyűjtöttük, majd ráöntöttük a 40 ml *Agrobacterium* szuszpenziót. Az explantumokat 20 percig tenyésztettük együtt az *Agrobacterium*-mal sötétben, lassú (50 rpm) rázatás mellett. Az inkubáció letelte után az explantumokat többször lemostuk infekciós MS táptalajjal, majd további két napos együttenyésztésre visszahelyeztük ugyanarra a táptalajra, amiről levettük őket.

3.5.2. A *Craterostigma plantagineum* genetikai transzformációja

A transzformációhoz a kalluszosításnál leírtak szerint indítottunk kultúrákat azzal a különbséggel, hogy az autoklávozást követően steril szűréssel 50 µM AS-t adtunk a táptalajhoz. A transzformációra a 2-3. napon került sor a fent leírtak szerint. A 2 napos *Agrobacterium*-os együttenyésztés után szelekciós CI táptalajra helyeztük az explantumokat, amely 150 mg/l kanamycint és 500 mg/l cefotaximot tartalmazott. Kéthetenként passzáltuk a explantumokat. A 4-6. héten regeneráló táptalajra (PR) passzáltuk a fejlődő kalluszokat, amely 150 mg/l kanamycint és 350 mg/l cefotaximot tartalmazott. A fejlődő növényeket leválasztottuk az explantumokról és mikroszaporító táptalajra helyeztük át, amely 100 mg/l kanamycint tartalmazott.

3.5.3. A *Ramonda myconi* genetikai transzformációja

A transzformációhoz a kalluszosításnál leírtak szerint indítottunk kultúrákat azzal a különbséggel, hogy az autoklávozást követően steril szűréssel 50 µM AS-t adtunk a táptalajhoz. A transzformációra a 2-3. napon került sor a fent leírtak szerint azzal a különbséggel, hogy kiindulási anyagnak teljes levélkorongokat használtunk, amelyeken közvetlenül az együttenyésztés előtt steril injekciós tűvel mikrosérüléseket hoztunk létre. A két napos *Agrobacterium*-os együttenyésztés után szelekciós kalluszosító táptalajra helyeztük az explantumokat, amely 1 mg/l kanamycint és 400 mg/l cefotaximot tartalmazott. Kéthetenként passzáltuk az explantumokat. A 4-6. héten regeneráló táptalajra (RA) passzáltuk a fejlődő kalluszokat a levélkoronggal együtt, amely 1 mg/l kanamycint és 200 mg/l cefotaximot tartalmazott. A fejlődő növényeket leválasztottuk az explantumokról és mikroszaporító táptalajra helyeztük át, amely 1 mg/l kanamycint tartalmazott.

3.6. DNS extrakció és PCR analízis

A feltételezetten transzformáns és kontroll növények totál DNS-ét Qiagen Plant Mini Kit-el (Qiagen GmbH, Hilden, Németország), míg a plazmid DNS izolálást *E. coli*-ból Qiagen Plasmid Mega Kit-el végeztük a gyártó által mellékelt protokollt követve. A kivont DNS koncentrációját Hoefer TKO-100 fluoriméterrel határoztuk meg.

A *C. plantagineum* esetében a PCR reakciót egyszeres pufferben (Promega) végeztük, ami 2,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dATP-t, dTTP-t, dCTP-t és dGTP-t (Pharmacia), 3 U / minta Taq polimeráz (Promega), 100 ng növényi, vagy 10 pg plazmid DNS-t és 1 µM oligonukleotid primert tartalmazott. Az 1500 bp hosszúságú *gus* fragmentum amplifikálásához a következő primer párt használtuk:

gus-specifikus oligonukleotid:
(-) 5’ - CGG TGA TAC ATA TCC AGC CAT – 3’
(+) 5’ - GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG – 3’

A PCR reakciókat Perkin Elmer Cetus berendezésen futtattuk le a következő programot alkalmazva: pre-denaturáció 94 °C-on 4 percig majd 35 cikluson keresztül 94 °C-on 1 percig denaturáció, annealing 55 °C-on szintén 1 percig, majd 72 °C-on lánchosszabbítás 1,5

percig. A végső lánchosszabítást 72 °C -on 7 percig végeztük. Az amplifikációs produktumokat elektroforetikusan különítettük el 1 %-os agaróz / ethidium-bromid gélen.

A *R. myconi* esetében a PCR reakciókat egyszeres pufferben (Eurobio, Németország) végeztük, ami 1 mM $MgCl_2$-ot, 200 μM dATP-t, dTTP-t, dCTP-t és dGTP-t (Pharmacia), 3 U / minta Taq polimerázt (Eurobiotaq), 25 pmol / 25 μl oligonukleotid primert, valamint 100 ng növényi, vagy 10 pg plazmid DNS-t tartalmazott. Az *nptII* génre specifikus fragment (750 bp) amplifikálására a következő primerpárt használtuk:

nptII-specifikus primer pár:
(+) 5'-GGA GAG GCT GCT ATT CGG CTA TG-3'
(-) 5'-CAT GAT ATT CGG CAA GCA GG-3'

A PCR reakciókat Perkin Elmer Cetus berendezésen futtattuk le a következő programot alkalmazva: denaturáció 94 °C-on 1 percig, annealing 60 °C-on szintén 1 percig, majd 72 °C-on lánchosszabbítás 1,5 percig 35 cikluson keresztül. A ciklusokat megelőzte egy 3 perces 94 °C-os pre-denaturáció, majd követte egy végső lánchosszabbítás 72 °C-on 6 percig. Az amplifikációs produktumokat elektroforetikusan különítettük el 1,5 %-os agaróz-ethidium-bromid gélen.

3.7. Southern analízis

A *Craterostigma plantagineum* és a *Ramonda myconi* esetében is a *gus* gén detektálásakor a tisztított növényi DNS-t (10 μg) egy éjszakán át *Bam*HI és *Hin*dIII restrikciós enzimekkel emésztettük. A termékeket elektroforetikusan szétválasztottuk és nitrocellulóz membránra (Hybond-C, Amersham) kötöttük. A pFF19G plazmidból származó, 1,9 kb hosszúságú *Pst*I fragment reprezentálta a *gus* kódoló szekvenciát (Timmermans és mtsai., 1990), amelyhez random priming módszerrel (Feinberg és Vogelstein, 1982) kötöttük a P^{32} izotóppal jelölt dCTP-t. A hibridizációt és az autoradiográfiát a Sambrook és mtsai. (1989) által kifejlesztett módszer szerint végeztük el.

3.8. A GUS riportergén aktivitásának hisztokémiai vizsgálata

A GUS riportergén tranziens és stabil expressziójának hisztokémiai vizsgálatát a Jefferson (1987), valamint a Jefferson és mtsai. (1987) által leírt módon végeztük. A transzformált és a kontroll kalluszokat illeve növényeket a GUS gén által kódolt β-glükoronidáz enzim szubsztrátját (X-gluc) tartalmazó pufferbe helyeztük. Az enzimreakciót egy éjszakán át pufferes vattadugóval lezárt Eppendorf csövekben 37 ^{o}C-os termoblokkon inkubálva végeztük.

3.9. Statisztikai analízis

A vizsgálatokat minden esetben több ismétlésben végeztük (legtöbbször 3-5-szöri ismétlésben). Egy adott kísérlet leírásakor mindig megadtuk, hogy mit tekintünk statisztikai szempontból ismétlésnek. Ez az információ minden esetben az Eredmények fejezet megfelelő részében, vagy a kiértékelő táblázat magyarázatában található. Az adatokat középérték analízissel értékeltük ki, a szórásokat pedig a középértékek eltéréséből számítottuk ki (Sváb, 1981).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A mikroszaporítás kidolgozása

4.1.1. A *Craterostigma plantagineum* mikroszaporításának kidolgozása

A *Craterostigma* mikroszaporítására, szövettenyésztésére és *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformációjára már létrehoztak korábban egy módszert (Furini és mtsai, 1994). Ennek az eljárásnak azonban számos hiányossága volt – rossz minőségű kiindulási növényanyag a kalluszosításhoz, gyenge válaszreakció a kalluszosítás során, nagyszámú deformált és hiperhidratált növény jelent meg a regeneráció során –, ami miatt sem nekünk, sem másoknak nem sikerült reprodukálni a módszert. A hiperhidratáltság, mint a sikeres szövettenyésztés egyik kritikus faktora túlzott etilén fejlődéssel, klorofill hiánnyal, gyenge sejtfalképződéssel és a szövetek túlzott hidratációjával kapcsolható össze. Az ilyen fiziológiájú növények megnyúltak, vékonyak, átlátszóak és törékenyek. A hiperhidratált szöveteknek alacsony a regenerációs képessége és a regenerált növények is nagy arányban hiperhidratáltak lesznek.

A hiperhidratáltság egyik oka az *in vitro* környezet okozta stressz, amiben jelentős szerepet játszik az alacsony pH. Méréseink szerint autoklávozás után az MS táptalaj pH-ja – annak ellenére, hogy autoklávozás előtt 5,8-ra beállítottuk – 4 és 4,5 közé csökkent. Ezt az értéket még tovább csökkentette (3,5 pH-ra), ha a Furini és mtsai. (1994) által leírtak szerint autoklávozás után aszkorbinsavat és citromsavat adtunk a táptalajhoz. Ennek kiküszöbölésére minden liter táptalajhoz 10 ml K-foszfát puffert adtunk. Ezzel a pH-t 6,6-6,8 körül tudtuk stabilizálni.

A *C. plantagineum* esetében jellemző a nagymennyiségű polifenol kiválasztás, aminek az egyik következménye a toxikus reaktív oxigéngyökök megjelenése. Ennek kivédésére Furini és mtsai. antioxidáns keveréket (100 mg/l citromsav és 150 mg/l aszkorbinsav) használtak. Ezek azonban tovább csökkentették a táptalaj pH-ját, ezért mi ezeket 200 mg/l glutationnnal helyettesítettük, amit a fentebb leírt K-foszfát pufferben oldottunk fel és autoklávozás után sterilen szűrve adtunk a táptalajhoz.

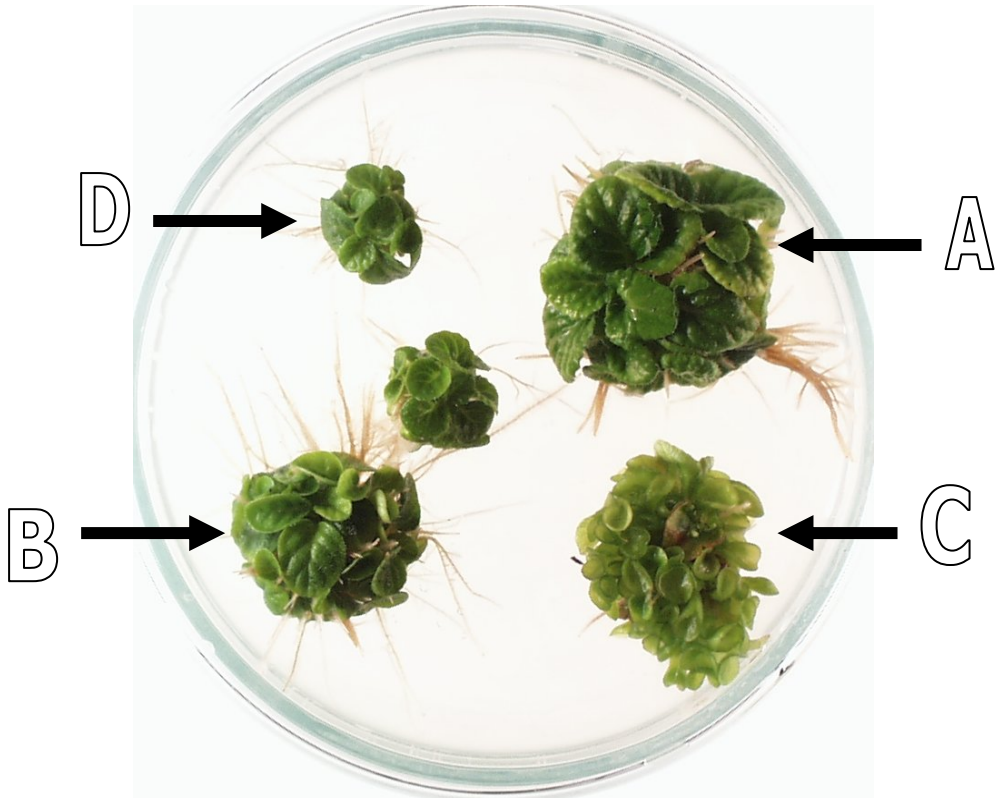
A fenti módosításokkal elkészített táptalaj (Toldi és mtsai., 2002) gyakorlatilag megszüntette a mikroszaporított növények hiperhidratáltságát (13. ábra).

13. ábra A képen mikroszaporító táptalajon, steril körülmények között, műanyag konténerben növekvő és virágzó *Craterostigma plantagineum* növények láthatóak. A *C. plantagineum* növények mikroszaporításában kritikus pontnak bizonyult a pH stabilizálása és a nagymennyiségben kiválasztott polifenolok semlegesítése.

4.1.2. A *Ramonda myconi* mikroszaporításának kidolgozása

A *R. myconi* rendkívül érzékenyen reagált az *in vitro* szövettenyésztés körülményeire. A táptalaj komponenseinek a legkisebb – nem megfelelő irányú – megváltoztatására is szöveti nekrózisokkal, polifenol kiválasztással, a levelek hiperhidratáltságával, fokozott vitrifikációval és a növekedés leállásával reagált (14. ábra).

Előkísérleteink során egyetlen olyan növényi hormonkészítményt sem találtunk, amely a mikroszaporítás hatékonyságát úgy növelte volna, hogy az ne menjen a levelek minőségének rovására (ez rendkívül fontos paraméter abból a szempontból, hogy a genetikai transzformáció kiindulási explantumaként csak a levélszegmensek jöhettek szóba). Ezért a mikroszaporítás során hormonokat nem alkalmaztunk. Az is nyilvánvalóvá vált számunkra a *C. plantagineum* példáján, hogy növényünk preferálja az alacsony sótartalmú táptalajokat, amelyek antioxidánst tartalmaznak. Ezen előzetes ismeretek alapján terveztük meg kísérleteinket. Az általunk összeállított táptalajok hatását a rajtuk inkubált növényanyag növekedési rátáján, valamint a növények fiziológiai állapotát jelző különböző – fentebb már említett – szimptómák segítségével mértük.



14. ábra A mikroszaporítás során különböző morfológiájú *Ramonda myconi* növények jelentek meg. A genetikai transzformáció szempontjából a gyors növekedésű, nagy levelű (A) fenotípus a legmegfelelőbb. A későbbiekben csak ezeket a növényeket szaporítottuk tovább. A kislevelű (B), hiperhidratált (C) és lassú növekedésű (D) növényeket nem szaporítottuk tovább.

A növények szaporodási rátája a vizsgált táptalajokon egyformának bizonyult – 3-4 hetente duplázódott az osztható rozetták száma – ezért a kiértékelés elsődleges szempontjául a növények minőségét, egészségi állapotát választottuk. A mikroszaporító alaptáptalaj kiválasztása során 3 táptalajt vizsgáltunk meg, amelyek egyike sem tartalmazott növekedési hormonokat. Az első a Murashige és Skoog (1962) által összeállított MS táptalaj volt. Másodikként a *Craterostigma* mikroszaporításához optimalizált CMS táptalajt választottuk, amely annyiban különbözött az MS-től, hogy tartalmazott 200 mg/l glutationt, ami 10 ml K-foszfát pufferben volt feloldva. Az előzetes tapasztalatoknak megfelelően a harmadik (RA) táptalaj szintén tartalmazott antioxidánst K-foszfát pufferben oldva, de 40 %-ra csökkentettük a makro- és mikroelemek mennyiségét az MS táptalajhoz képest. A táptalajok *R. myconi* növényekre gyakorolt hatását összefoglalva elmondhatjuk, hogy a legmegfelelőbb – nagylevelű, gyors növekedésű, szöveti nekrózis-, vitrifikáció- és polifenolosodás-mentes – növényeket a csökkentett összsó koncentrációjú RA táptalajon kaptuk (3. táblázat), amelyen a mikroszaporított növények átlagosan 65 %-a volt ilyen (Tóth és mtsai., 2004).

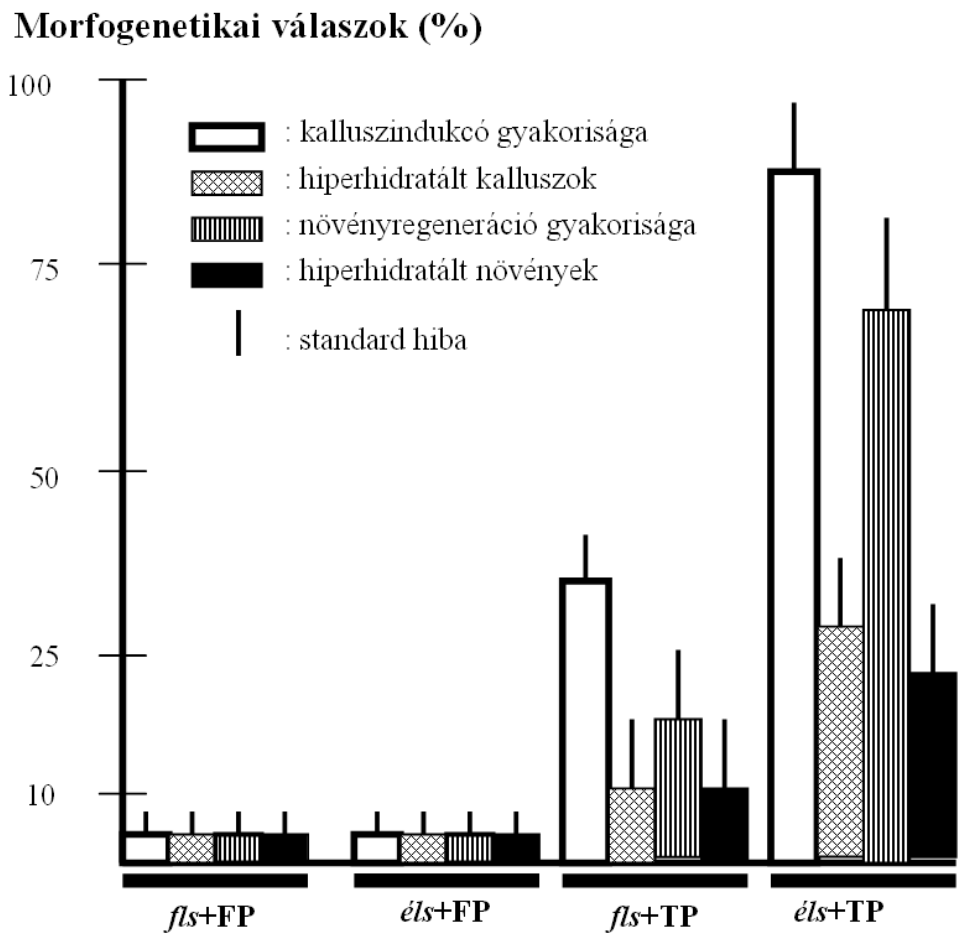
Szöveti szimptómák	Mikroszaporító táptalajok		
	MS[1] táptalaj	CMS[2] táptalaj	RA[3] táptalaj
Hiperhidratált levelű növények aránya (%)	25,3 (±9,2)	18,4 (±8,7)	4,7 (±2,7)
Nekrózisos növények aránya (%)	20,1 (±5,4)	28,5 (±10,1)	10,2 (±3,8)
Polifenolokat kiválasztó növények aránya (%)	20,5 (±6,4)	14,7 (±7,0)	6,5 (±2,3)
Normális, de kislevelű növények aránya (%)	25,6 (±5,7)	20,6 (±4,5)	15,2 (±3,3)
Normális és nagylevelű növények aránya (%)	10,0 (±2,6)	20,8 (±5,8)	65,6 (±7,6)

3. táblázat A mikroszaporító táptalajok hatása a *Ramonda myconi* mikroszaporított növények fiziológiai állapotára. A kísérletet öt ismétlésben végeztük táptalajonként 50 növényke inkubációjával. A szórásokat (±) az átlag súlyozott eltéréséből számoltuk. Szignifikáns eltérést állapítottunk meg azon értékek között, melyeknél a szórással kiegészítve sem volt átfedés.

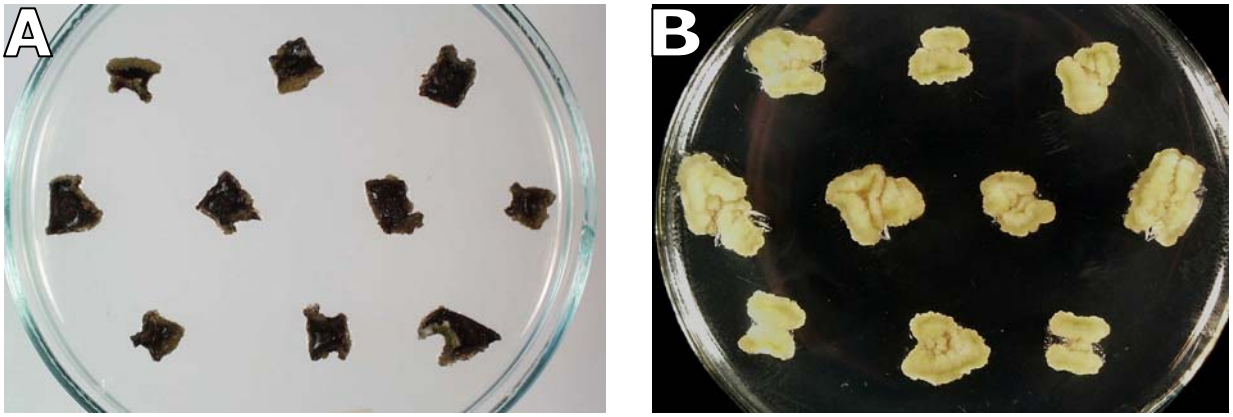
4.2. Növényregenerációs módszer kidolgozása

4.2.1. Kalluszindukció a *Craterostigma plantagineum* levélszegmenseken

A kalluszosítás kiindulási alapanyagául levélszegmenseket (5x7 mm) használtunk, amelyeket fiatal (<10 mm hosszú, fiatal levél szegmens, *fls*) és érett (10-50 mm hosszú, érett levél szegmens, *éls*) levelekből nyertünk. Kétféle protokollt követtünk a kalluszosítás során. Mindkét típusú (*fls, éls*) explantum felét a Furini és mtsai. (1994) által leírtak szerint kalluszosítottuk, míg a másik felét az általunk kifejlesztett CI táptalajra (lásd 3.3.1. fejezet) helyeztük. A kalluszképződés mértékében nem találtunk különbséget az *fls* és az *éls* típusú explantumok között, amikor a Furini féle módszert követtük (15. ábra). Az explantumok kevesebb mint 10 %-a mutatott megfelelő válaszreakciót, 90 %-uk a kalluszosítás korai szakaszában elpusztult. A hiperhidricitás már a kalluszfázisban megjelent, az explantumok 80 %-án volt megfigyelhető. Az ilyen szövetekből a növényregenerálás nem lehetséges (16. ábra, A). Ezzel szemben az *éls* explantumok kiemelkedő morfogenetikai választ mutattak az általunk fejlesztett CI táptalajon (Toldi és mtsai., 2002). A vágott élek mentén a kalluszosodás aránya 90 %-os volt (16. ábra, B), a hiperhidricitás pedig 19 %-ra csökkent (15. ábra). Az *fls* explantumok is megnövekedett morfogenetikai aktivitást mutattak a Furini módszerhez képest és a hiperhidratáltság mértéke is csökkent (15. ábra), de nem volt olyan métékű, mint az *éls* explantumok esetében.



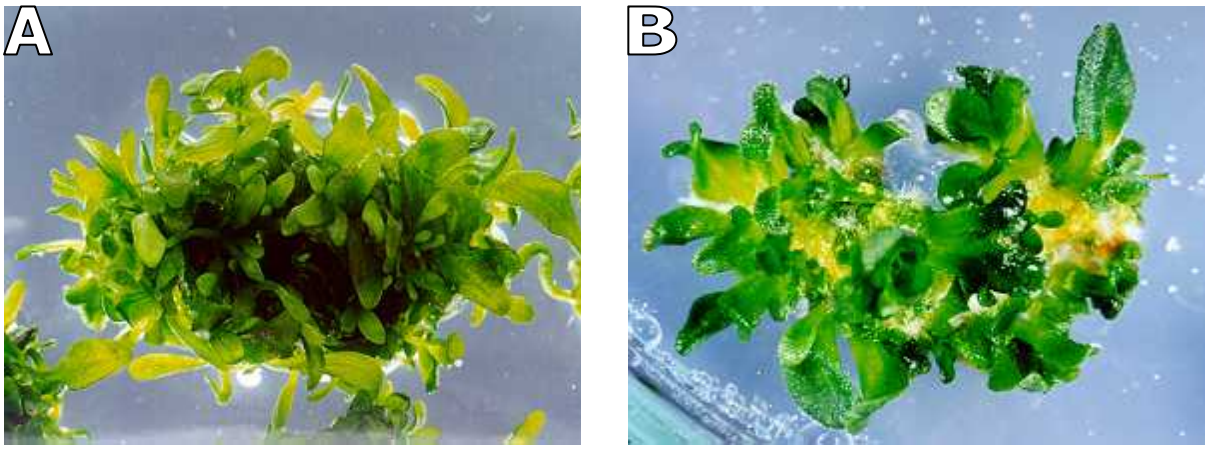
15. ábra A Furini és mtsai. (1994) által kifejlesztett protokoll (FP) és a saját fejlesztésű protokoll (TP) hatékonyságának összehasonlítása a *Craterostigma plantagineum* kalluszindukciója és növényregenerációja szempontjából. A kiindulási explatumok fele fiatal levél szegmensből (*fls*), míg a másik fele érett levél szegmensből (*éls*) származott.



16. ábra A Furini-féle módszer szerint kezelt *Craterostigma plantagineum* explantumok jelentős része már kallusz szinten is hiperhidratált volt és nekrotikus tüneteket mutatott (A). Ezzel szemben a saját fejlesztésű CI táptalajon a vágott élek mentén nagyarányú kalluszosodás volt megfigyelhető (B).

4.2.2. Növényregeneráció *Craterostigma plantagineum* kalluszból

A növényregenerálás során szintén két protokoll szerint vizsgáltuk az explantumokat. Azokkal, amelyeket eddig a Furini-féle módszer szerint kezeltünk, a regenerálás szakaszában is az általuk közöltek szerint jártunk el, ugyanakkor a CI táptalajon fejlődő kalluszokat a saját fejlesztésű NR (lásd 3.3.1. fejezet) táptalajra helyeztük át. A regenerálás során az NR táptalajon növekvő *éls* explantumok regenerációja mutatta a legnagyobb regenerálási gyakoriságot (15. ábra). A regenerált növények 65 %-a normális fenotípusú, egészséges növénnyé fejlődött (17. ábra, B), ami lényeges eredmény a Furini-féle módszerhez képest, ahol döntő többségében hiperhidratált növényeket kaptunk (17. ábra, A). Ezek a növények életképtelenek voltak üvegházi körülmények között, így ezt a módszert a genetikai transzformációs kísérletekhez nem lehetett felhasználni.



17. ábra A saját módszer szerint végzett növényregenerálás esetében normális fejlődésű, ép, egészséges *Craterostigma plantagineum* növényeket kaptunk (B), míg a már kallusz szinten is hiperhidratáltságot mutató explantumokból csak hiperhidratált növények differenciálódtak (A).

4.2.3. Kalluszindukció *Ramonda myconi* levélszegmenseken

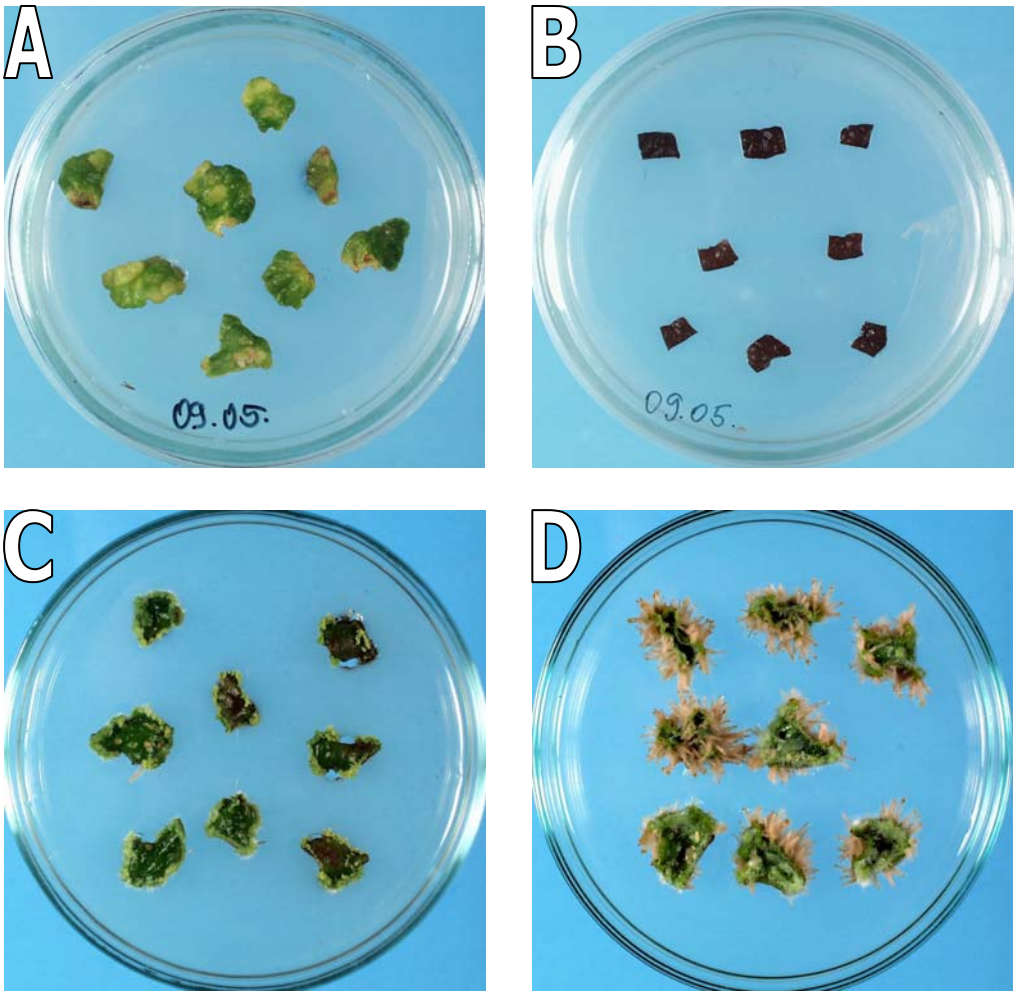
A mikroszaporítás során tapasztaltakhoz hasonlóan a *Ramonda myconi* levélszegmensek nagyon érzékenyen reagáltak a kalluszosítás körülményeire is. A felhasznált növekedésszabályozó anyagok (BAP, 6-benzilaminopurin; 2iP, 2-izopentenil adenin; adenin hemi-szulfát; picloram; NAA, α-naftilecetsav; IAA, indol-3-ecetsav) hatására a levélszegmenseken gyökerek, hajtások vagy kalluszok fejlődtek (4. táblázat). Direkt hajtásregeneráció jelent meg a legtöbb esetben. Kalluszfejlődést csak bizonyos hormonkombinációk esetében kaptunk és csak viszonylag szűk koncentráció tartományban (4.

táblázat). A harmadik héten a levelek vágott élei mentén 70 %-ban kalluszok jelentek meg, amikor az RA táptalaj 0,2 mg/l BAP-ot és 2 mg/l picloramot tartalmazott (18. ábra, A). Az explantumok túléléséhez és fejlődéséhez az auxin és a citokinin együttes jelenlétére volt szükség. Citokinin nélkül valamennyi explantum néhány napon belől elpuszult (18. ábra, B). Más hormonkombinációk is eredményeztek kallusz-szerű sejtproliferációt, de ezekben az esetekben a mikroszkópos vizsgálatok mindig azt bizonyították, hogy csak mikroszkópikus méretű hajtások tömeges differenciálódásáról van szó. A sikeres genetikai transzformációhoz azonban csak a fent említett hormon kombinációjú RA táptalajt használtuk. A fejlődő kalluszokat a levélszegmensekkel együtt 3 hetenként passzáltuk.

A növényregeneráció szempontjából ígéretes kombinációk is megjelentek a kísérletben. Alacsony koncentrációjú BAP és NAA (0,2 mg/l BAP, 1-2 mg/l NAA) kombinációja kevéssé nekrotikus és hiperhidratált direkt regeneránsokat eredményezett (18. ábra, C). Ezzel szemben az alacsony koncentrációjú BAP (0,2 mg/l) és magas koncentrációban jelenlévő NAA (5 mg/l) nagyarányú gyökeresedést idézett elő (18. ábra, D). Más növekedésszabályozók (adenin hemi-szulfát, 2iP) esetében a regenerálódó hajtások sok esetben hiperhidratáltak és nekrotikusak voltak.

Auxinok →		Picloram			NAA			IAA		
Citokininek ↓		0.2 mg/l	2.0 mg/	5.0 mg/l	0.2 mg/l	2.0 mg/	5.0 mg/l	0.2 mg/l	2.0 mg/	5.0 mg/l
BAP	0.2 mg/l	D	**K**	N	**H**	HGy	**Gy**	**H**	**Gy**	N
	2.0 mg/l	HH	N	N	**H**	HGy	N	HGy	**Gy**	N
	5.0 mg/l	N	N	N	HH	N	N	HGy	N	N
2iP	0.2 mg/l	D	**Gy**	**Gy**	HH	HGy	**Gy**	**Gy**	**Gy**	N
	2.0 mg/l	HGy	**Gy**	**Gy**	HH	HGy	N	HGy	HGy	N
	5.0 mg/l	HH	HGy	Gy	HH	N	N	HGy	N	N
Adenin hemisulphate	0.2 mg/l	D	**Gy**	N	D	**Gy**	N	**Gy**	**Gy**	N
	2.0 mg/l	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	5.0 mg/l	N	N	N	N	N	N	N	N	N

4. táblázat A *Ramonda myconi* levélszegmensek morfogenetikai válasza RA táptalajon a leghatékonyabb hormonkombinációk esetében. Minden kezeléshez legalább 50 explantumot használtunk 5 ismétlésben. Magyarázat: D – duzzadás; N – kiterjedt szöveti nekrózis; HGy – egyszerre jelent meg hajtás és gyökér; HH – hiperhidratált hajtás és levél; **Gy** – gyökérfejlődés; **H** – hajtásfejlődés; **K** – kalluszosodás.



18. ábra A növekedésszabályozó anyagok vizsgálata során egyértelművé vált, hogy citokinin és auxin együttes jelenlétére van szükség a *Ramonda myconi* explantumok fejlődéséhez (A). A csak auxint tartalmazó RA táptalajon az explantumok elpusztulnak (B). A növényregenerálás szempontjából fontos eredmény volt, hogy a 0,2 mg/l BAP , 1-2 mg/l NAA tartalmú táptalajon hajtások (C), míg a 0,2 mg/l BAP , 5 mg/l NAA esetén gyökerek jelentek meg (D).

4.2.4. Növényregeneráció *Ramonda myconi* kalluszból

Az előző kísérlet azt mutatta, hogy a növényregeneráció szempontjából a BAP és az NAA kombinációja lehet sikeres. Ennek vizsgálatához koncentrációsort állítottunk fel, ahol a fő értékelési szempont az egy explantumra eső hajtások száma volt (5. táblázat). Emellet figyelembe vettük a keletkező hajtások hiperhidratáltságát, az explantumok polifenol kiválasztásának és nekrózisának mértékét, mert ezek az üvegházi kiültetés során jelentősen befolyásolták a túlélést. A kísérlet igazolta, hogy önmagában az auxin vagy citokinin nem elegendő az explantumok túléléséhez továbbá, hogy a 0,2 mg/l BAP, 1-2 mg/l NAA hormonkombináció eredményezte a legtöbb (11,2 – 14,9 hajtás/explantum) egészséges hajtást (19. ábra).

A növényregeneráció gyakorisága (hiperhidratáció és nekrózis mentes hajtások / levél szegmensek száma)							
BAP koncentráció (mg/l)	NAA koncentráció (mg/l)						
	0.00	0.05	0.10	0.20	1.00	2.00	5.00
0.00	0	0.3±0.05	0.3±0.04	0	0	0	0
0.05	0.5±0.2	5.3±0.4	5.1±0.3	4.4±0.6	4.1±0.3	4.0±0.3	2.8±0.3
0.10	0.8±0.3	5.4±0.5	5.9±0.6	6.7±0.9	7.3±0.4	7.6±0.3	4.3±0.4
0.20	0.7±0.4	6.0±0.3	6.2±0.5	7.6±0.4	14.9±1.1	11.2±1.0	4.9±0.4
1.00	0.4±0.1	4.1±0.3	6.7±0.4	9.1±0.9	8.0±0.7	8.1±0.5	5.5±0.5
2.00	0	3.8±0.4	4.2±0.4	4.9±0.5	6.5±0.4	6.1±0.7	5.2±0.6
5.00	0	2.0±0.2	3.1±0.3	2.9±0.3	3.9±0.2	5.5±0.4	4.1±0.9

5. táblázat Növényregeneráció optimalizálása *Ramonda myconi* kalluszból 200 mg/l glutationt és K-foszfát puffert tartalmazó RA táptalajon különböző koncentrációjú BAP és NAA jelenlétében. Minden kísérlethez 50 explantumot használtunk 3 ismétlésben (± szórás).

A további kísérletekben a K-foszfát puffer és az antioxidánsként használt glutation hatását vizsgáltuk a hiperhidricitás és a nekrózis gyakoriságára. Amikor a táptalaj pH-ját nem stabilizáltuk K-foszfát pufferrel, akkor a hormonok nagyobb koncentrációja esetén 40-60 %-kal csökkent a regenerációs gyakoriság (6. táblázat).

A növényregeneráció gyakorisága (hiperhidratáció és nekrózis mentes hajtások / levél szegmensek száma)							
BAP koncentráció (mg/l)	NAA koncentráció (mg/l)						
	0.00	0.05	0.10	0.20	1.00	2.00	5.00
0.00	0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	5.0±0.5	5.0±0.7	4.4±0.6	4.0±0.5	3.0±0.6	0
0.10	0.6±0.3	5.1±0.6	5.3±0.8	6.4±0.7	7.0±0.5	5.4±0.8	0
0.20	0.5±0.3	5.5±0.7	5.4±0.8	7.0±0.8	9.1±1.0	6.2±1.3	0
1.00	0	3.0±0.4	3.0±0.6	6.9±0.9	3.3±0.4	2.2±0.9	1.2±0.7
2.00	0	2.0±0.4	1.6±0.5	2.1±0.6	2.1±0.5	1.4±0.8	0.9±0.6
5.00	0	1.1±0.3	1.3±0.3	1.1±0.4	0.9±0.3	0.7±0.3	0.3±0.2

6. táblázat Növényregeneráció optimalizálása *Ramonda myconi* kalluszból 200 mg/l glutation jelenlétében K-foszfát puffert nem tartalmazó RA táptalajon különböző koncentrációjú BAP és NAA jelenlétében. Minden kísérlethez 50 explantumot használtunk 3 ismétlésben.

Abban az esetben, amikor a K-foszfát puffert tartalmazta az RA táptalaj, de nem tartalmazta a glutationt, 20-25 %-os, szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a növényregenerálás mértékében (7. táblázat).

A növényregeneráció gyakorisága (hiperhidratáció és nekrózis mentes hajtások / levél szegmensek száma)							
BAP koncentráció (mg/l)	NAA koncentráció (mg/l)						
	0.00	0.05	0.10	0.20	1.00	2.00	5.00
0.00	0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	4.1±0.5	4.0±0.6	3.2±0.6	3.0±0.5	2.9±0.5	2.0±0.3
0.10	0.4±0.2	4.4±0.5	4.5±0.7	5.6±0.7	6.1±0.6	5.8±0.7	3.2±0.4
0.20	0.4±0.2	4.8±0.4	4.8±0.7	6.6±0.8	11.2±0.9	8.9±0.8	3.4±0.4
1.00	0	3.0±0.5	4.7±0.6	7.9±0.8	6.3±0.6	6.7±0.6	4.0±0.3
2.00	0	2.7±0.3	3.4±0.5	3.6±0.4	4.8±0.5	4.9±0.6	3.5±0.3
5.00	0	1.9±0.2	2.2±0.4	2.5±0.4	2.8±0.4	3.0±0.5	2.8±0.2

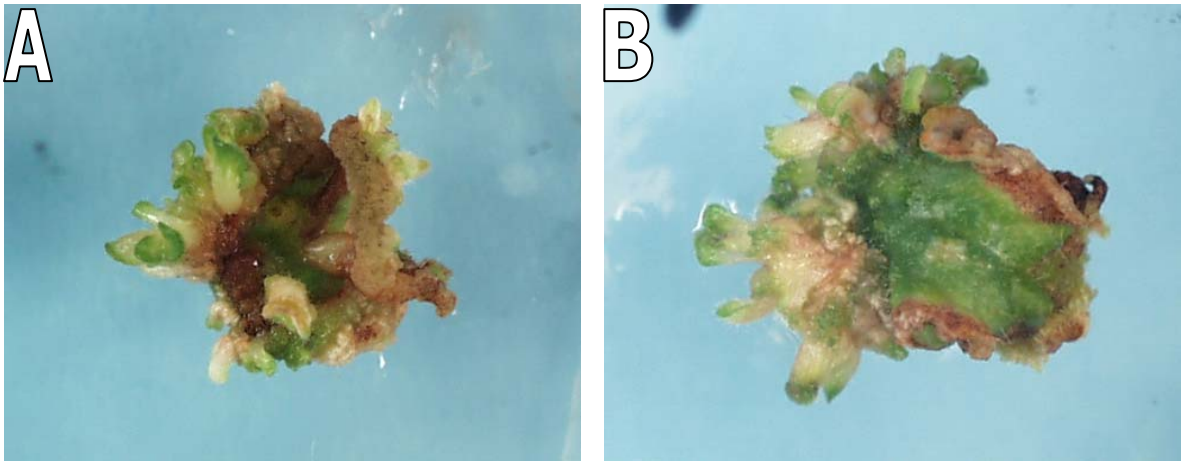
7. táblázat Növényregeneráció optimalizálása *Ramonda myconi* kalluszból 200 mg/l K-foszfát puffert tartalmazó RA táptalajon különböző koncentrációjú BAP és NAA jelenlétében. Minden kísérlethez 50 explantumot használtunk 3 ismétlésben.

A növényregeneráció hatékonysága abban az esetben volt a legrosszabb, amikor az RA táptalaj sem glutationt sem K-foszfát puffert nem tartalmazott (8. táblázat).

A növényregeneráció gyakorisága (hiperhidratáció és nekrózis mentes hajtások / levél szegmensek száma)							
BAP koncentráció (mg/l)	NAA koncentráció (mg/l)						
	0.00	0.05	0.10	0.20	1.00	2.00	5.00
0.00	0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	3.4±0.5	2.9±0.5	2.5±0.6	2.2±0.4	2.2±0.6	1.5±0.4
0.10	0.3±0.2	3.6±0.4	3.2±0.6	3.9±0.8	4.0±0.9	3.8±0.8	2.4±0.6
0.20	0.3±0.2	3.8±0.5	3.6±0.7	4.1±0.7	9.9±1.3	6.8±1.1	2.6±0.7
1.00	0	2.5±0.4	3.9±0.7	4.9±1.0	5.4±0.7	5.7±0.7	2.9±0.8
2.00	0	2.2±0.4	2.6±0.4	2.7±0.6	3.8±0.8	3.8±0.7	2.7±0.8
5.00	0	1.4±0.2	2.0.±0.3	1.6±0.5	2.1±0.6	2.4±0.5	1.9±0.4

8. táblázat Növényregeneráció optimalizálása *Ramonda myconi* kalluszból 200 mg/l glutationt és K-foszfát puffert nem tartalmazó RA táptalajon különböző koncentrációjú BAP és NAA jelenlétében. Minden kísérlethez 50 explantumot használtunk 3 ismétlésben.

A regeneráló explantumok (19. ábra, B) 60 %-án gyökerek is fejlődtek, azonban ezt az arányt sikerült 80 %-ra javítanunk azzal, hogy az RA táptalajhoz a regeneráció utolsó fázisában 0,05 mg/l BAP-ot és 5 mg/l NAA-t adtunk. Két hétig tartottuk a növényeket a gyökereztető táptalajon majd 3 hétre hormonmentes mikroszaporító táptalajra helyeztük át őket. A megerősödött, jól fejlett növényeket üvegházba ültettük ki.



19. ábra *Ramonda myconi* esetében a hiperhidricitás és a nekrózis leggyakrabban a hormonok nem megfelelő koncentrációjú alkalmazásakor illetve az antioxidáns és a K-foszfát puffer hiányában keletkezett (A). Ezzel szemben morfológiailag teljes értékű növényeket regeneráltunk az általunk kifejlesztett RA táptalajon (B).

4.3. Genetikai transzformáció

4.3.1. A *Craterostigma plantagineum Agrobacterium tumefaciens* vektorra alapozott genetikai transzformációja

4.3.1.1. Az *Agrobacterium*-os transzformáció hatékonyságának növelése mechanikai és biokémiai módszerekkel

A genetikai transzformáció eléréséhez kétféle módszert vizsgáltunk meg. Az „A” módszer esetében a Horsch és mtsai. (1988) által kétszikűek *Agrobacterium*-mal való genetikai transzformációjához kifejlesztett eljárást alkalmaztuk kis módosításokkal. A „B” módszer esetében a Hiei és mtsai. (1997) által egyszikűek transzformációjához kialakított technikát használtuk kis módosításokkal. Mindkét módszer esetében a levélszegmensek fele fiatal, másik fele teljesen kifejlett (*fls, éls*) levelekből származott.

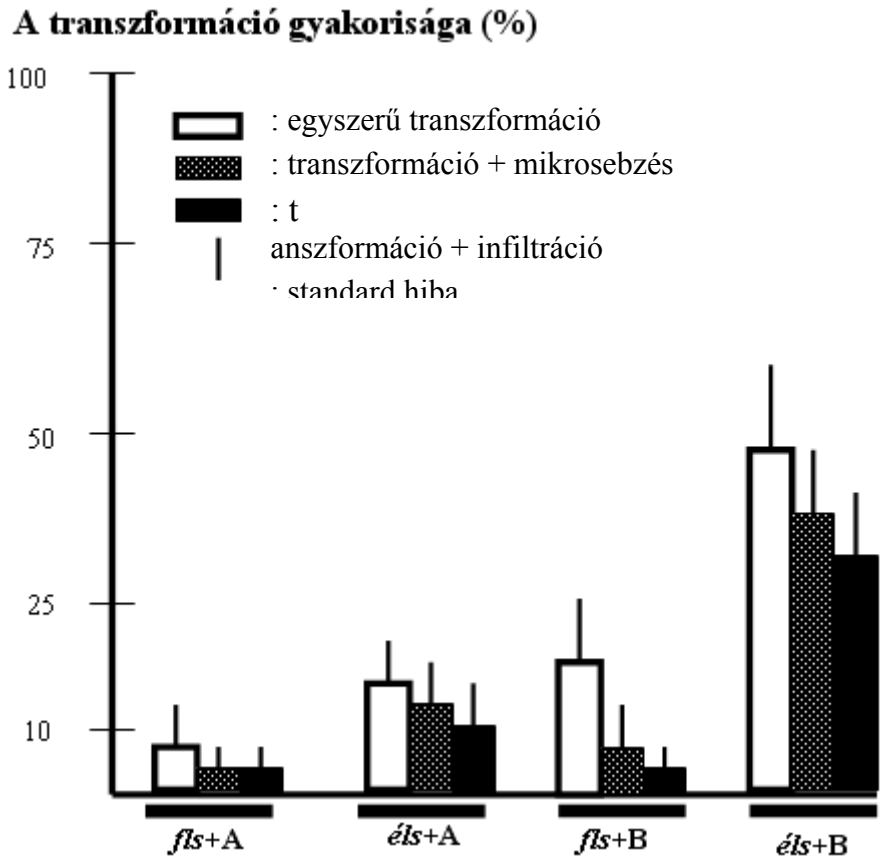
Az „A” módszernél az *fls* és *éls* explantumokat CI táptalajon inkubáltuk a transzformációt megelőzően 2 napig. A transzformációhoz használt *Agrobacterium* törzset 250 ml-es Erlenmeyer lombikban szaporítottuk fel. A lombikban 50 ml folyékony ABM táptalaj volt (Chilton és mtsai., 1974), ami 25 mg/l kanamycint és 100 mg/l rifampicint tartalmazott. A baktérium kultúrát egy éjszakán át rázattuk (200 rpm) 28 °C-on. A 2 napig előkezelt levélexplantumokat 3 különböző módon készítettük elő a transzformációra. Az első csoportban nem alkalmaztunk további előkészítést, a levélkéket 10 ml folyékony MS táptalajt tartalmazó Petri csészékbe helyeztük, amelyekhez 1 ml baktérium szuszpenziót pipettáztunk. Az együttenyésztést 20 percig végeztük majd steril szűrőpapíron szárítottuk az explantumokat és további 2 napra visszahelyeztük őket ugyanarra a táptalajra, amiről levettük. A második esetben hasonlóan jártunk el, azzal a különbséggel, hogy közvetlenül az együttenyésztés előtt mikrosérüléseket hoztunk létre génpuska segítségével gyorsított volfram szemcsékkel (Jenes és mtsai., 1996; Öktem és mtsai., 1999). A harmadik esetben az *Agrobacterium*ok bejutását elősegítendő infiltráltuk a levélszegmenseket 15 másodperc, 3 perc, 10 perc és 20 perc időtartamig.

A „B” módszer esetében szintén CI táptalajra preparáltuk a levélszegmenseket a transzformációt megelőzően két nappal, de a táptalajhoz az autoklávozás után sterilen szűrve hozzáadtunk 50 µM AS-t. A baktériumokat szintén 250 ml-es lombikban szaporítottuk fel, de itt 50 ml CPY infekciós folyékony táptalajt használtunk, ami 1 g/l élesztőkivonatot, 5 g/l triptont, 5 g/l szacharózt, 500 mg/l $MgSO_4x7H_2O$-t, 2 g/l MES, 25 mg/l kanamycint és 100 mg/l rifampicint tartalmazott. A kultúrát egy éjszakán át rázattuk (200 rpm), 28 °C-on. A megfelelő denzitású baktérium szuszpenziót lecentrifugáltuk (10 perc, 8000 rpm) majd a pelletet 40 ml folyékony MS infekciós táptalajban reszuszpendáltuk. A táptalaj egyharmad mennyiségben tartalmazott MS makro- és mikroelemeket, 10 mg/l thiamint, 1 g/l kazein hidrolizátumot, 10 g/l glükózt és az *Agrobacterium*-ok számára kémiai szignálnak számító fenolvegyületet, 50 µM AS-t. A leveleket Petri csészébe gyűjtöttük, majd ráöntöttük a 40 ml baktérium szuszpenziót. A fertőzés ebben az esetben is 20 percig történt enyhe rázás mellett majd steril szűrőpapíron lecsepegtettük az explantumokat és további 2 napra visszahelyeztük őket ugyanarra a táptalajra, amiről levettük. A „B” módszernél is ugyanazt a 3 féle előkezelést alkalmaztuk közvetlenül a transzformáció előtt mint az „A” módszernél.

A 2 napos inkubáció után valamennyi explantumot azonos CI táptalajra helyeztük, ami 150 mg/l kanamycint és 500 mg/l cefotaximot tartalmazott. Két hetes periódusokban passzáltuk a kultúrákat, majd 4-6 hét elteltével regeneráló táptalajra helyeztük át az explatumokat, ami szintén tartalmazott 150 mg/l kanamycint, de cefotaximból már csak 350

mg/l-t. A fejlődő, feltételezhetően transzgénikus növényeket 100 mg/l kanamycin tartalmú mikroszaporító táptalajon tenyésztettük tovább.

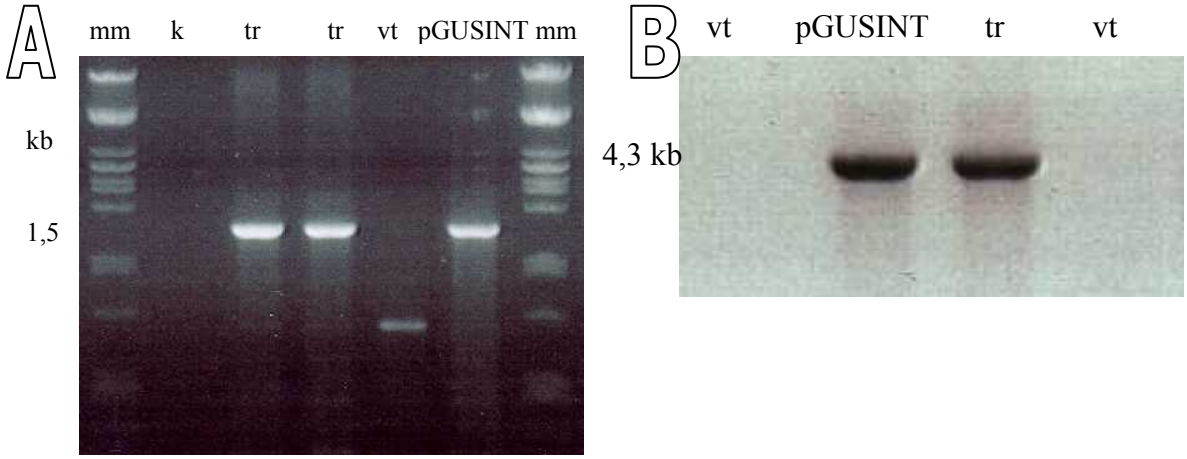
A két módszer során különböző fizikai és kémiai eljárásokat alkalmaztunk a genetikai transzformáció megvalósításához és a hatékonyság növeléséhez. Az eredmények azt mutatták (20. ábra), hogy a fizikai módszerek – a mikrosebzés és az infiltráció – egyaránt, szignifikánsan csökkentették a transzformáció hatékonyságát. Ezzel szemben a transzformáció kémiai körülményeinek változtatása (AS használata, aldóz típusú cukor forrás, szerves nitrogén forrás, alacsony pH és sókoncentráció) az infekciós táptalajban pozitívan befolyásolta a transzformációt a bakteriális *vir* gének aktiválásán keresztül. Például a éls explantumok esetén az „A" módszer 13 %-os eredményességéhez képest a módosított B módszerrel 45 %-os transzformációs gyakoriságot lehetett elérni (20. ábra).



20. ábra A fizikai eljárások alkalmazása egyértelműen rontotta a *Craterostigma plantagineum* transzformáció hatékonyságát, míg a növényi sérülések alkalmával megjelenő fenolszármazékokat szimuláló acetosziringon – mint a bakteriális *vir* gének aktivátora – alkalmazása szignifikánsan növelte a transzformáció sikerét. A kiindulási explantum kora is fontos tényező a hatékony transzformációs eljárásban. Az érett levelekből nyert szegmensek sokkal jobban viselték az *in vitro* körülmények és a transzformációs eljárás okozta stresszt mint a fiatal levélszegmensek. A kísérleteket öt ismétlésben végeztük.

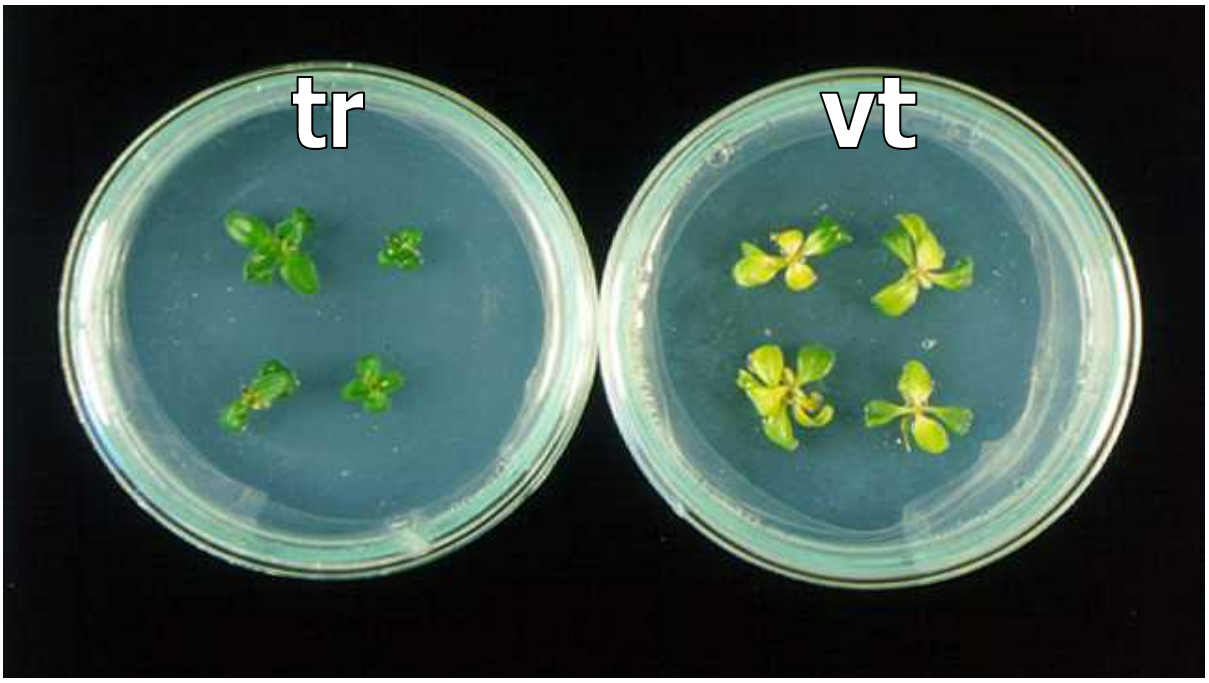
4.3.1.2. Szelekciós táptalajon regenerált növények vizsgálata PCR analízissel és Southern-hibridizációval

A *gus* gén integrációját a növényi genomba Southern-hibridizációval bizonyítottuk (21. ábra, B). A tisztított növényi DNS-ből *Hind*III és *Bam*HI restrikciós enzimek emésztésével kapott fragmentumokat hibridizáltuk *gus* próbával, amely egy 4,3 kb méretű fragmentumhoz hibridizált. A PCR reakció során *gus* specifikus primereket alkalmazva (lásd 3.6. fejezet) szaporítottuk fel a transzgén jelenlétét bizonyító 1,5 kb nagyságú szakaszt. A kontroll növényekben nem volt amplifikáció (21. ábra, A).



21. ábra Az 1,5 kb hosszúságú *gus* specifikus szakasz a transzgénikus *Craterostigma plantagineum* növényekben amplifikálódott, míg a vad típusú kontrol növényekben nem (A). A Southern hibridizáció eredményét mutaja a B kép. Magyarázat: tr – transzgénikus, vt – vad típus, mm – molekulárs méret marker, k – kotrol.

A transzgénikus és vad típusú növények T_2 generációját is teszteltük, hogy megőrzik-e a transzgénikus növények utódai az idegen géneket. A 150 mg/l kanamycint tartalmazó táptalajon a transzgénikus növények normális fejlődést mutattak, míg a vad típusú növények kifehéredtek (22. ábra).

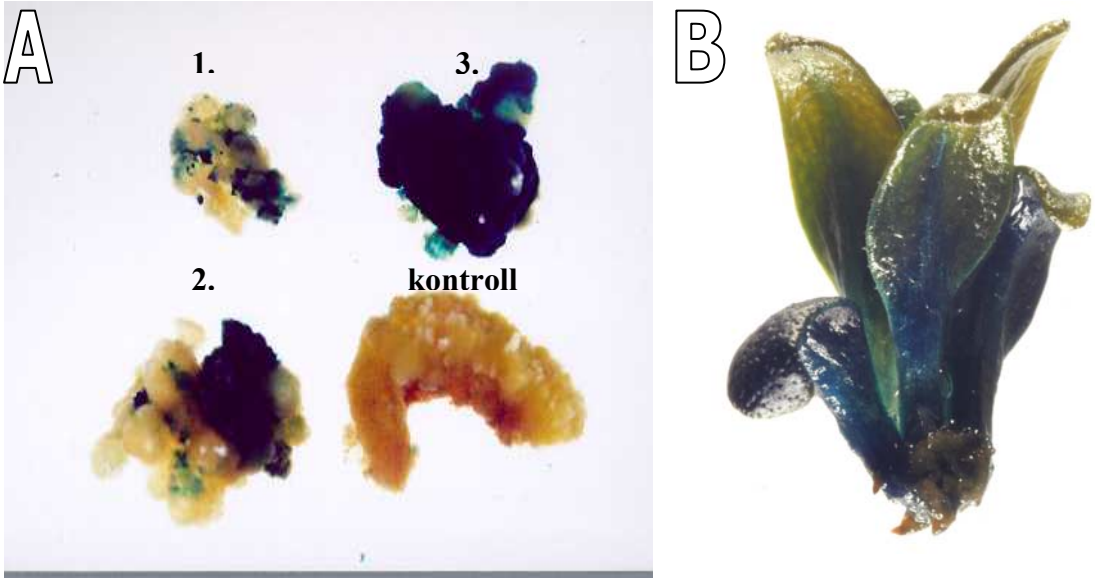


22. ábra A trnszgénikus *Craterostigma plantagineum* növények (tr) második generációja is túlélte a 150 mg/l kanamycin antibiotikum kezelést, míg a vad típusú növények (vt) jól láthatóan kifehéredtek, ami a klasszikus tünete a kanamycin hatásának.

4.3.1.3.A feltételezhetően transzgénikus kalluszok és növények vizsgálata GUS festéssel

A transzformáció során használt p35S::GUSINT plazmid konstrukció sok előnyös tujadonsággal bírt. Ezek egyike, hogy a növényi sejtekbe átjutó és ott a kromoszómába beépülő T-DNS-ben a *gus* gént kódoló szekvencia tartalmaz egy intront. Mivel a bakteriális transzkripció során az intron nem vágódik ki, a transzláció során olyan hibás fehérje keletkezik, amely nem képes funkcióját ellátni. A hisztokémiai vizsgálat során ez azt eredményezi, hogy ha a baktériumban történik is az intront tartalmazó *gus* génről fehérjeképződés, akkor sem fogunk – a szubsztrátként használt X-Gluc hozzáadása után – kékülést tapasztalni, mivel a hibás fehérje nem tudja bontani ezt a vegyületet. Azaz, ha a festési eljárás során kékülést tapasztalunk, akkor azt csak a növényi sejtek kromoszómájába integrálódott *gus* gén fehérjeterméke eredményezhette.

A szelekciós eljárás során a folyamatos szelekciós nyomás hatására a 6. hét végére a keletkezett kallusz sejtek 70-80 %-a mutatott kék színeződést (23. ábra, A). A regenerált növények esetében elvégzett festés is egyértelműen bizonyította a *gus* gén sikeres transzlációját (23. ábra, B).



23. ábra A hisztokémiai festés egyértelműen bizonyította a *gus* gén sikeres transzlációját. A szelekciós nyomás hatására, a 3. passzálás utána a *Craterostigma plantagineum* kallusz sejtek 70-80 %-a festődött, míg a kontroll kalluszok egyáltalán nem színeződtek el (A). A bizonyítottan transzgénikus növények festődése is igen erőteljes volt (B).

4.3.2. A *Ramonda myconi Agrobacterium tumefaciens* vektorra alapozott transzformációja

4.3.2.1. Az *Agrobacterium tumefaciens* elölésére és a transzgénikus explantumok szelekciójára használt antibiotikumok hatása a növényregenerációra

Az aminoglikozid típusú antibiotikumok széles körben elterjedt szelekciós ágensek, melyeket a molekuláris genetikában transzgénikus baktériumok, gombák, növények és állatok szelekciójára használnak. Az aminoglikozid típusú antibiotikumok kapcsolódva a sejt riboszómáihoz megakadályozzák a normális fehérjeszintézist, aminek következtében a rezisztencia gént nem expresszáló sejt elpusztul az adott antibiotikum jelenlétében.

A legismertebb aminoglikozid típusú antibiotikumok:

- Kanamycin
- Neomycin
- Geneticin (G-418)
- Gentamycin
- Paramomycin
- Vistamycin
- Neamine

A növénybiotechnológiában három neomicin-foszfotranszferáz gént használnak szelekciós markerként: *ntpI, ntpII* és *ntpIII*. Ezek közül a *neomicin-foszfotranszferáz II* (*ntpII*) a legelterjedtebb. Az *ntpII*-t az *Esherinchia coli* K12-es törzsének Tn5-ös transzpozonjáról izolálták. A gén az aminoglikozid-3'-foszfotranszferáz (aph(3')-II) enzimet kódolja, ami úgy semlegesíti az antibiotikumot, hogy ATP jelenlétében foszforilálja azt (ATP + Kanamycin = ADP + Kanamycin 3'-foszfát). Ezáltal a megváltozott szerkezetű antibiotikum nem képes a sejt riboszómájához való kapcsolódásra. Itt azonban rögtön utalnunk kell arra a tényre, hogy az antibiotikumoknak a növényi sejttenyészetek esetén is vannak nem specifikus mellékhatásai, amelyek csökkentik a transzgénikus növények előállításának hatékonyságát sikeres transzformáció esetén is. Ilyen például a fenti reakcióegyenletből következő tény, hogy az *npt* gének által kódolt enzimek az antibiotikumok semlegesítésére a növényi sejtek ATP-jét használják fel, csökkentve azok energiatartalékait. Ezért, valamint a *R. myconi* szövettenyészetek extrém érzékenysége miatt szükség volt az *A. tumefaciens* elölésére és a transzgénikus szövetek szelekciójára használt antibiotikumok morfogenetikai hatásának tesztelésére.

Elsőként az *A. tumefaciens* transzformáció utáni elölésére használt baktérium-sejtfal szintézis gátlókat teszteltük a *R. myconi* levélszegmens explantumok *in vitro* morfogenezisére gyakorolt hatásukon keresztül.

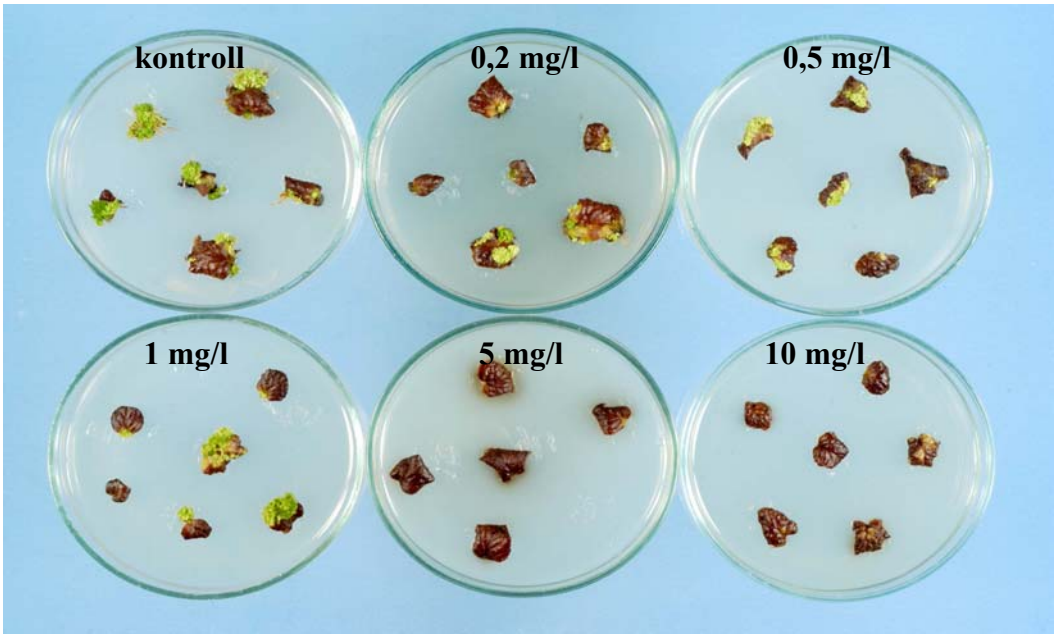
Előkísérleteinkből tudtuk, hogy a timentin esetén legalább 150 mg-ot, a cefotaxim esetén legalább 350 mg-ot kell tartalmaznia 1 liter táptalajnak ahhoz, hogy a transzformált szöveteket *A. tumefaciens* mentesíteni tudjuk. Ugyanakkor azt is tapasztaltuk, hogy a timentin koncentrációja nem lehet több 300 mg/l-nél, a cefotaximé pedig 500 mg/l-nél, mert e fölött már súlyos szöveti nekrózist okoznak. Tehát viszonylag szűk koncentrációtartományon belül kellett keresnünk a legmegfelelőbbet, azt ami a 2 x 2 hetes inkubáció alatt (2 hét volt a passzálási időintervallum) minimális mortalitás (max: 15%) mellett megfelelő *A. tumefaciens* elleni védelmet is biztosít. A timentin esetén a mortalitási ráta alapján megfelelő legmagasabb koncentráció sem jelent biztos antibakteriális védelmet, míg a cefotaxim esetén a mortalitási ráta alapján optimális koncentráció egyben az *A. tumefaciens* elleni védelem szempontjából is megfelelő. Ezért a transzformáció során 400 mg/l cefotaximot használtunk a fentebb részletezett célra.

Következő lépésként kiválasztottuk az aminoglikozid típusú antibiotikumok közül azt, amelyik a legkevesebb káros mellékhatással rendelkezik a stressz-érzékeny *R. myconi* levélexplantumokra nézve, másrészt toxikus hatása időben elnyújtva jelentkezik (9. táblázat).

Szelekciós ágensek	Koncentrációk (mg/l)						
	0,1	**0,2**	**0,5**	**1,0**	**2,0**	**5,0**	**10,0**
Kanamycin	**90,1±8**	**87,3±11**	**82,1±14**	**78,9±5**	***75,1±7***	5,9±2	1,7±1
G-418	**92,5±9**	**89,8±7**	**79,2±7**	**73,6±9**	***60,3±7***	3,7±2	2,5±1
Neomycin	**89,1±9**	**78,5±8**	**63,0±9**	***40,2±8***	20,9±5	7,3±3	5,9±2
Paramomycin	**83,0±6**	**79.9±8**	**67,2±9**	***50,5±9***	33,5±4	4,1±1	1,9±1

9. táblázat Az aminoglikozid típusú szelekciós ágensek különböző koncentrációinak hatása a nem transzformált *Ramonda myconi* levélszegmensek túlélésére. Az explantumokat - kéthetente passzálva – egy hónapig inkubáltuk RA kalluszindukciós táptalajon, majd újból egy hónapig RA regenerációs táptalajon. Az összes táptalaj tartalmazott 400 mg/l szűrve sterilizált cefotaximot és a táblázatba foglalt szelekciós ágensek egyikét különböző koncentrációkban. A táblázat adatai a 2 hónapos inkubálást túlélő explantumok százalékát adják meg az összes explantumot 100%-nak tekintve. A vastagított számok azt jelzik, hogy az explantumok nem csak egyszerűen túléltek, hanem növényregeneráció is megfigyelhető volt rajtuk. A nem vastagított számok a nem regeneráló, de túlélő explantumokat reprezentálják.

Az elnyújtott hatás azért nagyon fontos szempont, mert a *R. myconi* növényregenerációs rendszere a könnyen szövettenyészthető növényekhez képest lényegesen lassúbb (Tóth és mtsai., 2004), így időt kell biztosítanunk a transzgénikus sejtvonalak elégséges felszaporodásához. Az *A. tumefaciens* elölésre használt antibiotikumokhoz hasonlóan a szelekciós ágenseknek is kettős célnak kellett megfelelni a kiértékelés során. Lehetőleg minél nagyobb legyen a túlélő explantumok aránya egy adott antibiotikum koncentráció mellett, ugyanakkor a növényregeneráció már nemkívánatos a transzgénikus szövetrészek majdani szelektálhatósága miatt (24. ábra).



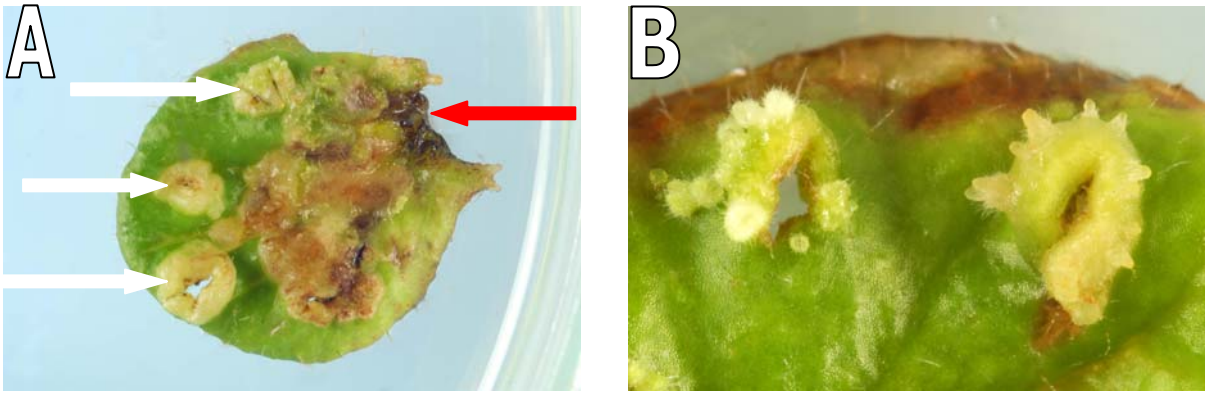
24. ábra Emelkedő koncentrációjú kanamycin hatása a *Ramonda myconi* levél explantumok túlélésére és morfogenezisére.

4.3.2.2. Az *Agrobacterium tumefaciens* sejtek penetrációját elősegítő mikrosebzés hatása a transzformáció hatékonyságára

A genetikai transzformáció eredményessége szempontjából fontos kérdés, hogy az *A. tumefaciens* sejtek célszövetbe való bejutása hatékonyan történik-e, sebzett felületek mérete ehhez megfelelő-e és, hogy az itt elhelyezkedő növényi sejtek rendelkeznek-e gyógyulási és regenerációs képességgel.

Előkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a stressz-érzékeny *R. myconi* levélszegmens explantumainak vágott szélei fokozatosan elbarnulnak, elhalnak és emiatt a regeneráció a vágott szélektől – ami az *A. tumefaciens* elsődleges infekciós zónája – távolabb valósul meg. Ezért a transzformáció során a levélszegmensek belső részeit steril injekciós tű segítségével 3-5 helyen átlyukasztottuk és vizsgáltuk a sebzett területek morfogenezisét (25. ábra).

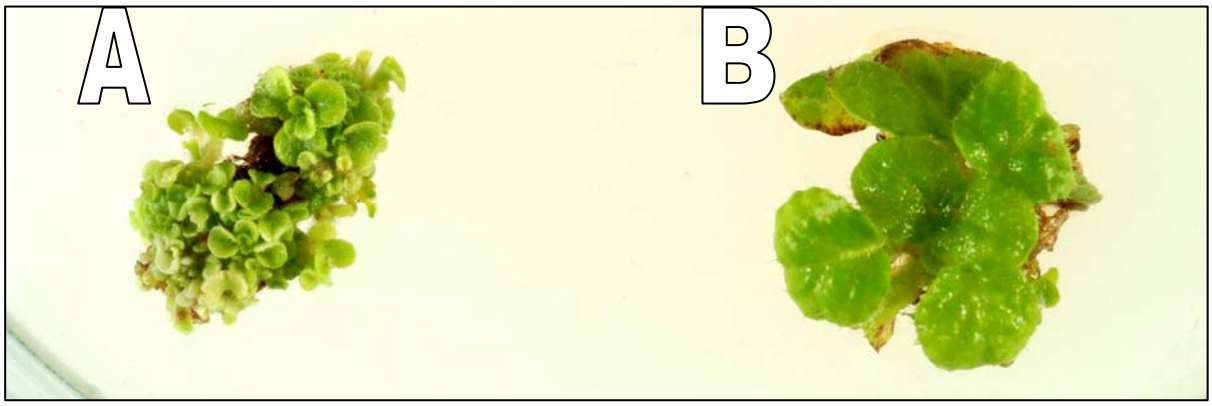
A steril tűvel való átlyuggatás olyan mechanikai sérüléseket eredményezett, amelyeknél az egységnyi sebfelületre eső egészséges szövettömeg aránya jóval nagyobb, mint a levélszélek szikével való eltávolítása esetén. Valószínűleg ez vezetett a lyukasztásos módszer esetében a seb környéki fokozott morfogenetikai aktivitáshoz. A transzformáció során ezért ezt a technikát alkalmaztuk az *A. tumefaciens* sejtek célszövetbe jutásának elősegítésére.



25. ábra A *Ramonda myconi* levelek alternatív sebzése (steril injekciós tűvel való átlyuggatás) erőteljes sejtosztódást eredményezett (A) a sebzett felületen (fehér nyilakkal jelölve). Ezzel szemben a nagyfelületű szikével vágott sebek mentén a levéllemez legtöbbször elhalt (piros nyíllal jelölve). A későbbiekben a mirosebzések mentén keletkező kalluszokból tudtunk legnagyobb valószínűséggel transzformáns egyedeket nyerni (B).

4.3.2.3. Kanamycin hatása a regeneráló növények morfogenezisére

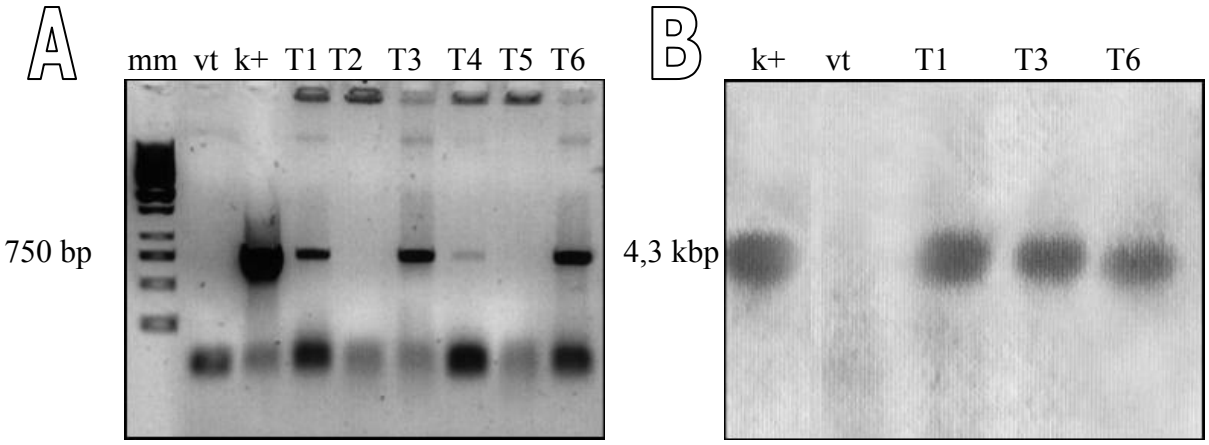
A transzformációt követő szelekciós fázisban jelentős különbségek mutatkoztak a regenerálódó növények morfogenezisében. A megelőző kísérleti szakaszban kialakított nem letális szelekciós rendszerben használt 1 mg/l kanamycin jellegzetes morfológiai hatásokat idézett elő. Ezek alapján vizuálisan is könnyen el lehetett különíteni a feltételezhetően transzgénikus regeneránsokat. Ezek a növények (26. ábra, B) gyorsabban fejlődtek, ép, egészséges leveleket fejlesztettek. Ezzel szemben a morfológiailag abnormális (26. ábra, A) növények lassan és korlátozott méretig növekedtek, a levelek az éleiktől indulva kifehéredtek (klasszikus kanamycin hatás). A vizuális szelekcióval kiválasztott regeneránsok nagy arányban transzgénikusnak bizonyultak. A fentebb leírtakkal kapcsolatban azonban nem végeztünk statisztikai analízist.



26. ábra Szelekciós táptalajon, nem letális koncentrációjú (1 mg/l) kanamycin jelenlétében vizuális szelekció végezhető a transzformációt követően a fejlődő *Ramonda myconi* növények között. A normális (B) morfológiájú regeneránsok nagy arányban transzgénikusnak bizonyultak, míg az abnormális (A) fenotípusúak soha.

4.3.2.4. Feltételezhetően transzgénikus növények PCR és Southern-blot vizsgálata

A feltételezetten transzgénikus növényekben molekuláris módszerekkel vizsgáltuk a transzformációs kazetták jelenlétét. Az *nptII* génre tervezett primerpár egyértelmű specifikus fragmentumot amplifikált a várt mérettartományban a szelekciós táptalajon regenerált *Ramonda* növények DNS mintáiból (27. ábra, A). A Southern-blot analízis (27. ábra, B) is megerősítette, hogy a PCR pozitív növények tartalmazzák a transzgént.



27. ábra A PCR reakció során (A) egy 750 bp hosszúságú *nptII* specifikus DNS fragmentet szaporítottunk fel a normális morfológiájú (T1, T3, T6) és az abnormális morfológiájú (T2, T4, T5) transzformánsok illetve a vad típusú (vt) *Ramonda myconi* növények tisztított teljes DNS-éből. A tisztított p35SGUSINT bináris vektort használtuk pozitív kontrollnak (k+). A molekuláris markernek (mm) a λ fág *Pst*I restrikciós endonukleázzal emésztett DNS-ét alkalmaztuk. Southern blot analízissel (B) bizonyítottuk a T-DNS integrációját a *Ramonda* genomba. A PCR pozitívnak bizonyult vonalakat (T1, T3, T6) vizsgáltuk tovább, pozitív kontrollnak (k+) a *Bam*HI és *Hin*dIII restrikciós endonukleázokkal emésztett p35SGUSINT plazmidot használtuk, míg negatív kontrollnak a vad típusú (vt) *Ramonda myconi*t.

Miután bizonyítottuk, hogy sikerült genetikailag transzformálni a *Ramonda myconi* növényt, megvizsgáltuk a transzformációs gyakoriságot, és a gyakoriságot befolyásoló tényezőket. Azt tapasztaltuk, hogy azoknak a levélexplantumoknak a jelentős többsége, amelyeknek a széleit szikével levágtuk, a transzformációt követően – már a 2 napos együttenyésztés alatt – a vágott szélektől indulva nekrotizálódtak. Ezzel szemben a steril injekciós tűvel átszúrt, ép szélű levélkorongokon a sérülések mentén kalluszfejlődés indult meg. Ezekből a kalluszokból regenerálódó növények közül kerültek ki a hisztokémiai festéssel, illetve a molekuláris módszerekkel is bizonyított transzgénikus növények (10. táblázat).

Az explantumok típusa és a transzformációs protokol		A transzformáció gyakorisága								
		A túlélők aránya (%) *	Regenerációs gyakoriság (%) *		Ebből PCR pozitív (%)		Ebből Southern pozitív (%)		ebből GUS pozitív (%)	
			Norm**	Abnorm**	Norm**	Abnorm**	Norm**	Abnorm**	Norm**	Abnorm**
vls	A módszer	11.5±2.1	0.0	8.3±2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	B módszer	13.9±3.5	0.0	7.5±1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
mls	A módszer	65.3±9.4	17.3±3.1	10.3±2.6	13,5±3.0	0.0	10.1±1.9	0.0	10.1±1.9	0.0
	B módszer	62.8±9.2	30.1±6.9	20.4±4.3	23.7±5.8	0.0	21.4±2.6	0.0	21.4±2.6	0.0

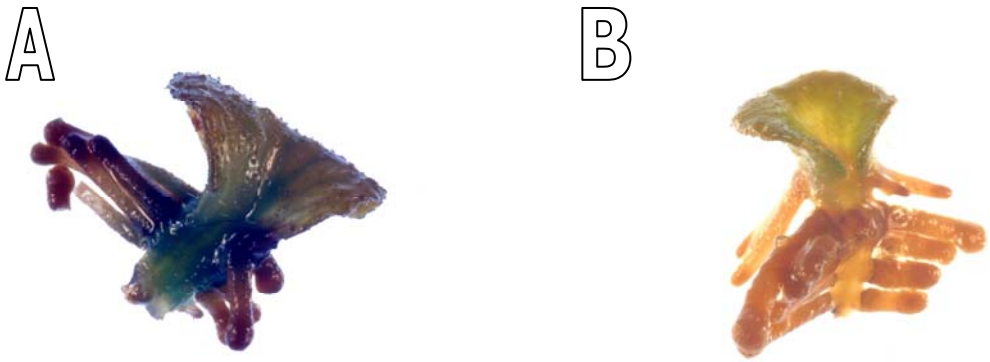
* a túlélés és a regeneráció gyakoriságát szelekciós körülmények között mértük

** a regenerált növények morfológiailag normális és abnormális fejlődést mutattak

10. táblázat A transzformáció szempontjából alapvető jelentőségűnek bizonyult a mikrosebzések használata illetve a *vir* gének indukálása acetosziringon használatává. A kísérletet három ismétlésben végeztük, minden egyes kezeléshez 100-100 explantumot használtunk. Magyarázat: vls – vágott szélű levélszegmens, mls – mikrosebzett levélszegmens, A módszer – Horsch és mtsai (1988) által kifejlesztett módszer, B módszer – az általunk kifejlesztett módszer.

4.3.2.5. Szelekciós táptalajon regenerált növények vizsgálata GUS festéssel

A regenerált növények közül az ép, egészséges, normális fejlődést mutató növényeket választottuk ki a GUS festés végrehajtásához. Megelőző kísérleteink során azonban kiderült, hogy a *Ramonda myconi* növények – lassú anyagcseréjük miatt is – egyfelől nagyon nehezen és lassan reagálnak a hisztokémiai festésre, másfelől nagyon gyorsan és érzékenyen reagálnak a vizsgáló oldat okozta stresszre, azaz hamar elpusztulnak. Emiatt igyekeztünk infiltrálással meggyorsítani a festék szövetek közé jutását, illetve a mikroszaporító táptalaj pH-ját stabilizáló K-foszfátra cseréltük a vizsgáló oldatban eredetileg használt Na-foszfátot. A transzgénikus növények kékülése a járulékos gyökerek differenciálódási alapjánál volt a legerősebb (28. ábra, A), ahol a legintenzívebb a sejtosztódás. A kontroll növények esetében nem tapasztaltunk kék elszíneződést (28. ábra, B).



28. ábra A *Ramonda myconi* lassú anyagcseréje miatt viszonylag lassan reagált a GUS festésre (A) és a festődés intenzitása is kisebb volt, mint a *Craterostigma plantagineum* esetében, de a kontroll növény esetében semmilyen elszíneződést nem tapasztaltunk (B).

4.4. Új tudományos eredmények

1., Módszert dolgoztunk ki a *Craterostigma plantagineum* és a *Ramonda myconi* mikroszaporítására, amelyen belül:

- megszüntettük az alacsony pH okozta hiperhidratáltságot K-foszfát pufferrel;
- csökkentettük a növények polifenol kibocsátásának káros hatásait a glutation, mint antioxidáns alkalmazásával;
- a *R. myconi* esetében a mikroszaporító táptalajban harmadára csökkentett MS sók koncentrációja bizonyíthatóan növelte – a későbbi transzformációhoz használható – a nagylevelű, gyorsan növő növények számát.

2., Módszert dolgoztunk ki a *C. plantagineum* és a *R. myconi* kalluszból való növény regenerációra, amelyen belül:

- kifejlesztettük mindkét növény kalluszindukciós táptalaját;
- bizonyítottuk, hogy megfelelő hatékonyságú kalluszindukció csak citokinin és auxin együttes jelenlétében lehetséges, meghatároztuk optimális koncentrációjukat;
- kifejlesztettük mindkét növény növényregenerációs táptalaját;
- optimalizáltuk a növényregeneráláshoz illetve a gyökereztetéshez szükséges hormonkombinációkat.

3., Kidolgoztuk a *C. plantagineum* és a *R. myconi* genetikai transzformációs módszerét, amelyen belül:

- bizonyítottuk, hogy az érett levélszegmensek (*éls*) használata növeli a transzformációs hatékonyságot;
- a *R. myconi* esetében bizonyítottuk, hogy a mikrosebzések alkalmazása kritikus fontosságú a sikeres transzformációhoz;
- a *R. myconi* esetében optimalizáltuk az *Agrobacterium* elölésére és a transzgénikus explantumok szelekciójához használható antibiotikumok típusát és koncentrációját.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A kiszáradástűrés kutatásának két modellnövénye közül a *Craterostigma plantagineum* esetében kidolgoztunk egy valóban reprodukálható, hatékony genetikai transzformációs módszert. A *Ramonda myconi* esetében pedig elsőként írtunk le módszert a szövettenyésztésére, valamint kifejlesztettük e növény *Agrobacterium tumefaciens*-re alapozott genetikai transzformációját is.

A kiszáradástűrés, és ezen keresztül valamennyi, a vízhiány okozta abiotikus stresszfolyamat megértésében a molekuláris biológiai ismeretek alapvető fontosságúak. A modern biotechnológia többek között az egyes növényekre kidolgozott genetikai transzformációs módszerek kifejlesztésével tudja segíteni ezeknek az ismereteknek a megszerzését. A *C. plantagineum* molekuláris tanulmányozása két évtizede kezdődött, de a jól működő transzformációs rendszer hiánya jelentősen gátolta az ismereteink bővítését. Kísérleteinket megelőzően már leírtak egy módszert (Furini és mtsai., 1994), azonban ezt a laboratóriumunkban nem sikerült megismételni. Kísérleteink során több, a szövettenyésztés és a genetikai transzformáció során felmerülő problémát (hiperhidratáltság, gyenge kalluszosodás, életképtelen regeneránsok) sikerült kiküszöbölnünk. Munkánknak köszönhetően lehetőség nyílik számos, az utóbbi időben izolált, a kiszáradástűrésben fontos szerepet játszó gén funkcionális analízisére. Hiszen mind a szensz/antiszensz, mind a „knock out" technikák alkalmazásához nélkülözhetetlen a genetikai transzformációs módszer.

Európában az edényes kiszáradástűrő növényeket a *Gesneriaceae* családba tartozó *Haberleae* és *Ramonda* fajok képviselik. Ezeket a fajokat csak az utóbbi időben kezdték tanulmányozni. Az általunk kifejlesztett szövettenyésztési eljárásokkal a steril laboratóriumi körülményeket kívánó vizsgálatokba is bevonhatóak. Emellett, mostmár rendelkezésünkre áll a *R. myconi* genetikai transzformációs módszere, amivel összehasonlító funkcionális genetikai analízisek is elvégezhetőek más kiszáradástűrő fajokkal, mint például a *C. plantagineum*mal.

A két növény szövettenyésztésében és transzformációs eljárásában tapasztalt hasonlóságokból arra következtethetünk, hogy más, rendszertanilag távol eső kiszáradástűrő növények esetében is sikerrel alkalmazhatóak lesznek ezek a módszerek, vagy a módszerek egyes részelemei.

Mindkét növény esetében tervezzük az ozmotikus stressztolerancia mechanizmusának élettani vizsgálatát a kifejlesztett transzformációs eljárás felhasználásával. Részletes biokémiai vizsgálatok alapján feltételezik, hogy ezeknek a növényeknek a fokozott ozmotikus

stressz-toleranciája elsősorban különleges cukoranyagcseréjüknek köszönhető (Schwall és mtsai., 1995, Scott, 2000). Laboratóriumunkban rendelkezünk olyan génkonstrukciókkal, melyek segítségével a növényeket extrém mértékű keményítőakkumulációra, vagy szacharóz túltermelésre tudjuk serkenteni. Módszerünk a fruktóz-2,6-difoszfát (Fru-2,6-P2) szignálmetabolit keményítő-, illetve szacharózszintézisre gyakorolt hatásán alapszik. A létrehozott transzformációs technikákkal ezek a konstrukciók bevihetők a növényekbe és igazolhatjuk, illetve kizárhatjuk a korábbi feltételezéseket.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A Föld népessége folyamatosan növekszik, azonban ezzel párhuzamosan a művelésbe vont területek nagysága inkább csökken. Ennek egyik oka az utóbbi időben egyre erősödő üvegházhatás. Ez sok más, mérsékeltövi országban is szélsőséges időjárást eredményez, amelynek következménye a sokszor éveken keresztül elhúzódó aszály. Sajnos ennek kiküszöbölése öntözéssel egyre nehezebb, hiszen a rendelkezésre álló édesvíz készletek egyre jobban fogynak és a meglévő készleteket inkább ivóvízként használjuk fel, mint öntözővíznek. Ha olyan kultúrnövényeket tudnánk termeszteni, amelyek képesek tolerálni a nagyobb mértékű vízhiány okozta káros stresszfolyamatokat úgy, hogy közben nem csökken túlzottan a termésmennyiségük, akkor jelentősen enyhíthetnénk a növekvő élelmiszerigény és a fogyatkozó termőterületek közötti egyre erősödő feszültséget.

A ma termesztett növényeink is igyekeznek elkerülni a vízdeficit okozta károsodásokat morfológiai és fiziológiai változásokkal, amelyek eredőjeként lényegesen csökken a leveleken keresztüli vízpárologtatás. A legdrasztikusabb és leggyakrabban megfigyelhető reakció, hogy a növény megszabadul levelei egy részétől. Az erős napsütés és a magas hőmérséklet együttes hatására a megmaradt levelek gázcserenyílásai zárva maradnak és fokozódik a víz által nem átjárható viaszanyagok kiválasztása a levél külső felületére. Ezek azok az élettani alapmechanizmusok, amelyekkel a vízdeficitre érzékeny növények is rendelkeznek, de ezek csak arra elegendőek, hogy a víztartalmuk 10-15 %-os csökkenését képesek legyenek túlélni. Ennél komolyabb vízhiány esetén elpusztulnak.

A virágos növények egy különleges csoportja azonban képes tolerálni extrém mértékű vízveszteséget is. Ezt a csoportot a kiszáradástűrő növények alkotják. A kiszáradástűrő növények friss tömegének 70 %-át alkotja víz, de ha megszűnik a vízellátás, akkor ennek 90 %-át képesek elveszíteni úgy, hogy a rehidratáció után 48 órával már újból elérik a kiszáradás előtti metabolikus aktivitásukat. Természetesen az ilyen fokú vízhiány túléléséhez sokkal hatékonyabb védekező mechanizmusra van szükség, mint a vízdeficitre érzékeny növényeknél. Ez egyben azt is jelenti, hogy ennek a védelmi rendszernek az egyes tagjait valószínűleg jóval könnyebb megtalálni és a védekezés egész folyamatát is könnyebb felderíteni. Nem csoda hát, ha ezen növénycsoport ismert képviselői a *Craterostigma plantagineum* és a *Ramonda myconi* a növényi szárazságtűrés molekuláris genetikai és biokémiai vizsgálatának kísérleti modellnövényeivé váltak. Az utóbbi években számos olyan

gént, illetve genetikai szabályozóelemet (transzkripciós aktivátor-, promoter és ún. enhancer elemek) izoláltak belőlük, melyek specifikus aktivitással rendelkeztek a dehidratáció és rehidratáció során. Az izolált gének funkcionális analízise, és a szabályozás összefüggéseinek kiderítése azonban még hátra van. Ennek egyik oka volt, hogy ezen növények genetikai transzformációs rendszere nem állt rendelkezésre. Ezért célul tűztük ki, hogy a *C. plantagineum* és *R. myconi* transzformációs eljárását kidolgozzuk.

A *Craterostigma* esetében már publikáltak egy módszert (Furini és mtsai., 1994), de azt eddig sehol, senkinek nem sikerült megismételni. Mi is megpróbáltuk reprodukálni a leírtakat, de sajnos eredménytelenül. Ezt követően kísérleteket terveztünk egy jól működő, reprodukálható, hatékony szövettenyésztési és transzformációs rendszer kifejlesztésére mindkét növény esetében. A kezdeti tapasztalatok azt mutatták, hogy a növények egyformán érzékenyek a szövettenyésztési manipulációkra. Szuboptimális körülmények között lassan nőttek, gyakori volt a szöveti nekrózis, sok növény hiperhidratált lett és jelentős mértékű volt a polifenol kibocsátásuk. Ezekben hasonlítottak egymásra a *Craterostigma* és *Ramonda* növények, de a mikroszaporításukhoz, kalluszosításukhoz és a regenerációjukhoz különböző táptalajokra volt szükség. A *C. plantagineum* egy sivatagi növény és az életstratégiája ehhez alkalmazkodott, azaz a hosszú ideig tartó száraz időszakok között a rövid ideig tartó csapadékos időben kell gyorsan és hatékonyan felhasználni a rendelkezésre álló tápanyagokat és a vizet. Ez indokolta, hogy az *in vitro* tenyésztés alatt megmaradjon az MS táptalajban lévő magas ásványianyag tartalom. Ezzel szemben a *R. myconi* hegyvidéki környezetben él, ahol a szűkös ásványianyag forrásokhoz alkalmazkodva egy sokkal lassabb fejlődési program és metabolizmus alakult ki. Emiatt használtuk az MS sókat csak 40 %-os koncentrációban a *R. myconi in vitro* kultúráiban. Ennek helyességét igazolták az optimalizálás során elvégzett kísérletek eredményei.

A genetikai transzformáció előfeltétele egy hatékony növény-sejt-növény rendszer, aminek első lépése a kalluszindukció. Ebben a fázisban a két növény hasonló módon reagált a kísérletekben. A kalluszosodás megindításában mindkét esetben egy szintetikus auxin, a picloram bizonyult a legmegfelelőbbnek, de az is kiderült, hogy önmagában nem elegendő. Ha a piclorammal párhuzamosan nem tartalmazott a táptalaj kis koncentrációban citokinint, akkor az explantumok a kalluszosítás kezdeti stádiumában nekrotizálódtak, elpusztultak. Kísérleteink bizonyították, hogy az auxin (picloram) jelenléte mellett nélkülözhetetlen citokinin (BAP) adagolása a táptalajhoz.

További hasonlóság volt a két kiszáradástűrő növény *in vitro* kultúrájában, hogy a mikroszaporítás, a kalluszosítás és a növényregenerálás hatékonyságát alapvetően növelte,

amikor K-foszfát pufferrel stabilizáltuk a táptalaj pH-át illetve glutationt adtunk hozzá, mint antioxidánst. A glutation csökkentette a nekrózisok és a hiperhidratált növények arányát, a pH stabilizálás pedig hosszabb ideig tette lehetővé a növények tápanyagfelvételét az elöregedő táptalajból. Jól ismert, hogy a különböző ásványi anyagok felvételéhez az optimális pH 6-6,5 között mozog. A táptalajban, ahol a kezdeti pH-t 5,8-ra állítjuk be a szövettenyésztés első pár napja alatt 4-5 körüli értékre csökken, ami alapvetően befolyásolja az anyagok oldhatóságát és felvehetőségét, ezért rövid időn belül relatív ásványianyag hiány alakul ki. Valószínűleg ez volt az oka, hogy a pH stabilizálás mindkét növénynél 10-40 %-kal javította a mikroszaporítás és a növényregeneráció hatékonyságát.

Ezen a szövettenyésztési alapon kezdtük el a transzformációs kísérleteket. A transzformáció kiindulási explantumának választott levélszegmensek a két növény esetében teljesen eltérően viselkedtek. A *C. plantagineum*nál a kalluszosítási kísérletekben kifejlesztett módszer változtatás nélkül alkalmazható volt. A levélszegmensek vágott élei mentén nagymennyiségű kompakt kallusz keletkezett a transzformáció után. A dediferenciálódott kalluszsejtek közül szelekciós táptalajon sikerült a transzformánsok arányát megnövelnünk és belőlük transzgénikus növényeket regenerálnunk. Bebizonyosodott, hogy az alkalmazott fizikai eljárások (infiltráció és mikrolövedékekkel okozott sérülések) nem javították a transzformáció hatékonyságát, ellenben a kémiai stimuláció (alacsony pH, aldóz típusú szénforrás, szerves nitrogénforrás, acetosziringon) az együttenyésztés alatt jelentősen növelte a transzformációs gyakoriságot. Az is nyilvánvalóvá vált, hogy a Furini-féle módszerben alkalmazott fiatal levelek sokkal rosszabb kiindulási explantumok a transzformációhoz, mint a kifejlett, érett levelek.

A *R. myconi* transzformáció kezdetén azt tapasztaltuk, hogy a transzformáció során alkalmazandó valamennyi anyag és eljárás erős stresszreakciókat vált ki a növényből, ami gyors pusztuláshoz vezet. Emiatt optimalizálni kellett a baktérium elölésére szolgáló antibiotikum típusát és mennyiségét. Meg kellett határoznunk a transzformáns kalluszok felszaporításához használható antibiotikum mennyiségét is. A tapasztalt erőteljes stresszreakciók megjelenését megpróbáltuk csökkenteni azzal, hogy nem-letális szelekciós eljárást alkalmaztunk 1 mg/l kanamycin használatával. E módszer előnye, hogy a regeneráció során normális és abnormális fenotípusú transzformánsok jelennek meg, amelyek között vizuális szelekció végezhető. A megelőző kísérletekben kifejlesztett kalluszosítási eljárást azonban nem tudtuk alkalmazni, mert az *A. tumefacins*sel való együttenyésztés után a vágott élek mentén induló nekrózis következett be minden esetben, ami rövid időn belül valamennyi explantum pusztulását eredményezte. Ennek elkerülésére a transzformációhoz teljes

levélkorongokat használtunk, amelyeket közvetlenül az együttenyésztés előtt steril injekciós tűvel perforáltunk. A mikrosérülések mentén kallusz képződött, amelyekből a szelekció után transzformáns növényeket tudtunk regenerálni. A *C. plantagineum*nál alkalmazott kémiai stimulációt a *R. myconi*nál is eredményesen tudtuk alkalmazni.

Mind a *C. plantagineum* mind a *R. myconi* esetében hisztokémiai festéssel, PCR analízissel és Southern-blot analízissel igazoltuk a transzgén jelenlétét és működését.

A két modellnövény szövettenyésztésének és *A. tumefaciens* közvetítette genetikai transzformációs rendszerének kidolgozásával megnyílt az út a kiszáradástűrő növényekből izolált gének funkcionális analíziséhez. Ezáltal pontosabban megérthetjük, nem csak a növények, hanem valamennyi más élő szervezet válaszreakcióit a vízhiány okozta károsodás elkerülésre, amit később kultúrnövényeink abiotikus stressztoleranciájának javításában is felhasználhatunk. A kiszáradástűrésben szerepet játszó anyagok és folyamatok pontosabb megismerése révén megtudhatjuk, hogyan védik ezek a növények az életműködéshez nélkülözhetetlen sejtstruktúrákat, fehérjéket, örökítő anyagot.

7. SUMMARY IN ENGLISH

The world's population is continuously growing, while cultivated land surface is more likely to decrease. One of its reasons is the greenhouse effect, which has become more intensive lately. It causes extreme weather in many countries of temperate climate as well, often resulting in drought lasting for years. Its equilibration with irrigation is becoming unfortunately more and more difficult, because the earth is running out of fresh water supplies and the available supplies are rather used as drinking water. If plants able to tolerate negative stress resulting from an increased water shortage could be cultivated without a significant decrease in the yield, the tension resulting from a more intense food demand and a decreasing surface of cultivation could be mitigated.

Through physiologic and morphologic changes, plants cultivated today are trying too to avoid damages caused by water deficit, as a result of which evaporation through the leaves decreases significantly. The most drastic and most frequent reaction is when the plant gets rid of a part of its leaves. As a result of strong sunshine and high temperature, the stomata of the remaining leaves stay closed and non-water permeable wax is more intensively secreted to the surface of the leaves. Plants sensible to water deficit operate these basic physiologic mechanisms as well, but they can only survive a 10-15 % decrease of their water content. In case of a more severe water shortage, they die.

However, a special group of the flowering plants is able to tolerate an extreme level of water loss as well. This group is made up of the desiccation tolerant plants. The fresh mass of desiccation tolerant plants is made of 70 % water, but if water supply is cut, they are able to lose 90 % of it and after 48 hours following rehydration, they reach their original metabolic activity again. Naturally, a much efficient protection mechanism is needed to survive such water shortage compared to plants sensible to water deficit. This also means that it is much easier to find the different elements of this protection mechanism and to explore the whole protection process. Thus, it is not surprising that the popular representatives of this group of plants, *Craterostigma plantagineum* and *Ramonda myconi* has become molecular genetic and biochemical models of drought resistance experimentation. During the past few years, a number of genes and genetic control elements (transcription activators, promoters and enhancer elements) have been isolated from them which have got a specific activity during dehydration and rehydration. Functional analysis of isolated genes and the exploration of regulation relations still remain to be done. One of its reasons is that the genetic

transformation system of these plants is not yet known. Our objective is therefore to elaborate the transformation method of *C. plantagineum* and *R. myconi*.

A method has already been published for *C. plantagineum* (Furini et al., 1994), but no one has ever been able to repeat it. We also tried to reproduce it according to the description, unfortunately without success. Than we planned the experiments to develop a well functioning, reproduceable, efficient system of tissue reproduction and transformation in case of both plants. The initial experiences showed that both plants were equally sensible to tissue culture manipulations. Under suboptimal conditions, they grew slowly, suffered often from tissue necrosis, many of them became hyperhydrated, having elevated polyphenol emission. This was the case both with *C. plantagineum* and *R. myconi* species, but their micropropagation, callus induction and regeneration required different culture mediums. *C. plantagineum* is a desert plant, its life strategy has been adapted to such conditions, that is to say, long dry periods interrupted by short periods with precipitations, when the available nutrients and water have to be used quickly and efficiently. This justified to preserve a high MS culture medium mineral substance content in the *in vitro* culture. *R. myconi,* on the other hand, lives in an upland environment, where a much slower development and metabolism has emerged because of the restricted mineral substance resources. Therefore we used MS salts only in 40 % concentration in the *R. myconi in vitro* cultures, justified by the results of the experiments during optimisation.

A prerequisite of genetic transformation is an efficient plant-cell-plant system, having the starting point of callus induction. In this phase, the two plants have reacted in a similar way in the experiments. In callus induction a synthetic auxin, picloram has been found the best at both plants, but it was not sufficient alone. If besides picloram, the culture medium had not contained any cytokinin in low concentration, explants necrotised and died in the initial phase of callus induction. The experiences have justified that besides the presence of auxin (picloram), the dosage of cytokinin (BAP) to the culture medium was indispensable as well.

There were further similar elements in the *in vitro* cultures of the two desiccation tolerant plants: their efficiency of micropropagation, callus induction and plant regeneration increased when the pH of the culture medium had been stabilised with K-phosphate buffer and an antioxidant, glutathione had been added. Glutathione has decreased the proportion of necrotic and hyperhydrated plants and pH stabilisation allowed a longer lasting nutrient absorption from the aging culture medium. It is known that the ideal pH to the absorption of mineral substances is between 6 and 6,5. In the culture medium, if the initial pH is set to 5,8, it falls approximately to pH 4-5 during the first days of the tissue culture, basically affecting

substance solubility, therefore a relative mineral substance shortage appears within a short period. This is probably the reason why pH-stabilisation has improved by 10-40 % the efficiency of micropropagation and plant regeneration at both plants.

We have started transformation experiments on the basis of these tissue cultures. The leaf segments selected to be the initial explants of transformation have behaved completely differently. In case of *C. plantagineum*, the method developed in the callus induction experiments could be applied without any change. An important quantity of compact callus has been formed along the cut edges of the leaf segments after the transformation. From the dedifferentiated callus cells, we have increased the proportion of transformants on a selection culture medium and we could regenerate transgenic plants from them. It has been proven that the applied physical methods (infiltration and injuries caused by microbullets) has not increased transformation efficiency, while chemical stimulation (low pH, aldose-type carbon source, organic nitrogen source, acetosyringon) has significantly increased transformation frequency in the co-culture. It has became evident as well that the young leaves used in the Furini method are much worse initial explants of transformation than the developed, mature leaves.

At the beginning of the transformation of *R. myconi*, we have found that all material applicable in the transformation and in the method have induced strong stress reactions of the plant, leading to quick death. Therefore we had to optimise the type and quantity of the antibiotics used to kill the bacteria. We had to define the quantity of antibiotics needed to reproduce transformant calli as well. We tried to decrease the strong stress reactions by applying a non-lethal selection method using 1 mg/l kanamicyne. The advantage of this method is that transformants of normal and abnormal fenotypes are created and a visual selection can be done. However, we could not apply the callus induction method developed in the pre-experiments, because after co-culture with *A. tumefaciens,* cut edges had necrotysed in any case, which caused the death of all explants within short time. To avoid this, we have used complete leaf discs for the transformation which had been perforated with a sterile syringe right before the co-culture. Calli have been formed along the microinjuries and after selection we could regenerate transformant plants from them. The chemical stimulation applied in the case of *C. plantagineum* could be applied successfully in the case of *R. myconi* as well.

The presence and functioning of the transgene has been justified at *C. plantagineum* and at *R. myconi* as well by histochemical painting, PCR analysis and Southern-blot analysis.

The elaboration of the tissue culture and the genetic transformation system transmitted by *A. tumefaciens* of the two model plants has opened the opportunity for the functional analysis of genes isolated from desiccation tolerant plants. Through this, reactions to avoid damages caused by water shortage of not only the plants but any other living organism can be better understood, that may be used in the future in the improvement of the abiotic stress tolerance of cultivated plants. Through a better knowledge of the material and processes of desiccation tolerance, it can be discovered how these plants defend their cell structures, proteins and hereditary material indispensable for the vital functions.

MELLÉKLET

IRODALOMJEGYZÉK

Adams R. P., Kendall E. J. and Kartha K. K. (1990) Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical Systematics and Ecology* 18, 107–110.

Adamska I. and Kloppstech K. (1991) Evidence for the localization of nuclear-coded 22 kDa heat shock protein in subfraction of thylakoid membranes *European Journal of Biochemistry* 198, 375-381.

Alamillo J., Roncarati R., Heino P., Velasco R., Nelson D., Elster R., Brenacchia G., Furini A., Schwall G., Salamini F. and Bartels D. (1995) Molecular analysis of desiccation tolerance in barley embrios and in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum. Agronomie* 2, 161-167.

Albini F. M., Murelli C., Patritti G., Rovati M., Zienna P., and Finzi P. V. (1994) Low-molecular weight substances from the resurrection plant *Sporobolus stapfianus*. *Phytochemistry* 37, 137-142.

Ali-Benali M. A., Alary R., Joudrier P. and Gautier M. (2005) Comparative expression of five Lea Genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1730, 56-65.

Alpert P. (2000) The discovery, scope and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology* 151, 5-17.

Alpert P. (2006) Constrains of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *The Journal of Experimental Biology* 209, 1575-1584.

Alpert P. and Oechel W. C. (1985) Carbon balance limits the distribution of *Grimmia laevigata*, a desiccation tolerant plant. *Ecology* 66, 660-669.

Alpert P. and Oechel W. C. (1987) Comparative patterns of net photosynthesis in an assemblage of mosses with contrasting microdistributions. *American Journal of Botany* 74, 1787-1796.

Alpert P. and Oliver M. J. (2002) Drying without dying. In: Black M. and Pritchard H. W. (eds) *Desiccation and survival in plants*. CABI Publishing, New York, pp. 3-45.

Bartels D. (1999) Late embryogenesis abundant (LEA) proteins: expression and regulation in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. In: Bowles D. J., Smallwood M. F. and Calvert C. M. (eds) *Plant Responses to Environmental Stress*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 153-160.

Bartels D., Schneider K., Terstappen G., Piatkowski D. and Salamini F. (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum. Planta* 181, 27-34.

Bartels D., Alexander R., Schneider K., Elster R., Velasco R., Alamillo J., Bianchi G., Nelson D. and Salamini F. (1993) Desiccation-related gene products analyzed in a resurrection plant and in barley embryos. In: Close T. J. and Bray E. A. (eds) *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress.* Current Topics in Plant Physiology Series Vol. 10, American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp. 119-127.

Becquerel P. (1951) La suspension de la vie des spores des algues, lichens, et mousses aux confins du zéro absolue et rôle de la synérése réversible pour leur survie au dégel

expliquant l'existence de la flore polaire et des hautes altitudes. *Comptes Rendues de l'Académie des Sciences de Paris* 232, 22-25.

Bewley J. D. (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology* 30, 195-238.

Bewley J. D. and Krochko J. E. (1982) Desiccation tolerance. In: Lange O. L., Nobel P. S., Osmond C. B. and Ziegler H. (eds), *Encyclopedia of plant physiology*. Vol 12 B, Physiological Ecology II. Springer-Verlag, Berlin, pp. 325-378.

Bewley J. D. and Oliver M. J. (1992) Desiccation tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms. In: Osmond, C. B. & Somero, G. (eds), *Water and life: A comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 141-160.

Bianchi G., Gamba A., Limiroli R., Pozzi N. Elster R., Salamini F. and Bartels D. (1993) The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum* 87, 223-226.

Binns A. and Thomashow M. (1988) Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiology* 42, 575-606.

Black M., Corbineau F., Grzesik M., Guy P. and Come D. (1996) Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. *Journal of Experimental Botany* 47, 161-169.

Blomstedt C. K., Neale A. D., Gianello R. D., Hamill J. D. and Gaff D. F. (1998) Isolation and characterization of cDNAs associated with the onest of desiccation tolerance in the resurrection grass, *Sporobolus stapfianus. Plant Growth Regulation* 24, 153-161.

Bockel C., Salamini F. and Bartels D. (1998) Isolation and characterization of genes expressed during early events of the dehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum. Journal of Plant Physiology* 152, 158-166.

Bouchez D. and Höfte H. (1998) Functional genomics in plants. *Plant Physiology* 118, 725-732.

Braun A. C. (1947) Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. *American Journal of Botany* 34, 234-240.

Buitink J. and Leprince O. (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* Volume 331, Issue 10, 788-795.

Cavara F. (1897) Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. *Stazoni Sperimentale Agrarie Italiane* 30, 483-487.

Cazzonelli C. I., Velten J. (2004) Analysis of RNA-mediated gene silencing using a new vector (pKNOCKOUT) and an in planta *Agrobacterium* transient expression system. *Plant Molecular Biology Report* 22, 347-359.

Cazzonelli C. I., Velten J. (2006) An in vivo, luciferase-based, *Agrobacterium*-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. *Planta* 224, 582-597.

Child G. F. (1960) Brief notes on the ecology of the resurrection plant (*Myrothamnus flabellifolia*) with mention of its water absorbing abilities. *Journal of South African Botany* 26, 1-8.

Chilton M. D., Currier T. C., Farrand S. K., Bendich A. J., Gordon M. P.and Nester E. W. (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and P58 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 71, 3672–3676.

Chilton M. D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D, Montoya A. L., Gordon M. P. and Nester E. W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells – molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11 (2), 263-271.

Clegg J. S. (2001) Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128, 613-624.

Cooper K. and Farrant J. M. (2002). Recovery of the resurrection plant *Craterostigma wilmsii* from desiccation: protection vs repair. *Journal of Experimental Botany* 53, 1805-1813.

Cormack B. P., Valdiva R. H. and Falkow S. (1996) FACS optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

Csintalan Zs., Takács Z., Proctor M. C. F., Lichtenthaler H. K and Tuba Z. (1998) Desiccation and rehydration responses of desiccation tolerant moss and lichen species from a temperate semidesert grassland. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 84, 71-80.

Csintalan Zs., Proctor M. C. F., and Tuba Z. (1999) Clorophyll fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst, *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook & Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Annals of Botany* 45, 235-244.

Csintalan Z., Takács Z., Proctor M. C. F., Nagy Z. and Tuba Z. (2000) Early morning photosynthesis of the moss *Tortula ruralis* following summer dew fall in a Hungarian temperate dry sandy grassland. *Vegetatio*, 151 (1), 51-54.

Crowe J. H., Crowe L. M. and Jackson S. A. (1983) Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 220(2), 477-484.

Crowe L. M., Carpenter J. F. and Aurell W. C. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal* 242, 1-10.

Crowe J. H., Hoekstra F. A., and Crowe L. M. (1992) Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54, 579-599

Cuming A. C. (1999) LEA proteins in seed proteins. In: Shewry P. R. and Casey R. (eds) *Seed proteins*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 753-780.

Cushman C. J. and Bohnert J. H. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* Vol. 3 No. 2, 117-124.

Davey M. C. (1997) Effects of continuous and repeated dehydration on carbon fixation by bryophytes from the maritime Antarctic. *Oecologia* 110, 25-31.

Daxinger L., Hunter B., Sheikh M., Jauvion V., Gasciolli V., Vaucheret H., Matzke M. and Furner I. (2008) Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 13 (1), 4-6.

Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., van Montagu M. and Leemans J. (1985) Efficient octopine *Ti* plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* 13, 4777-4788.

Degl'Innocenti E., Guidi L., Stevanovic B. and Navari F. (2008) CO2 fixation and chlorophyll a fluorescence in leaves of Ramonda serbica during a dehydration–rehydration cycle. *Journal of Plant Physiology* 165, 723-733.

Deng X., Phillips J., Bräutigam A., Engstrom P., Johannesson H., Ouwerkerk P. B. F., Ruberti I., Salinas J., Vera P., Iannacone R., Meijer A. H. and Bartels D. (2006) A homeodomain leucine zipper gene from *Craterostigma plantagineum* regulates abscisic acid responsive gene expression and physiological responses. *Plant Molecular Biology* 61, 469-489.

Ditzer A., Kirch H. H., Nair A. and Bartels D. (2001) Molecular characterization of two alanin-rich Lea genes abundantly expressed in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in response to osmotic stress and ABA. *Journal of Plant Physiology* 158, 623-633.

Ditzer A. and Bartels D. (2006) Identification of a dehydration and ABA-responsive promoter regulon and isolation of corresponding DNA binding proteins for the group 4 LEA gene *CpC2* from *C. plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 61, 643-663.

Djilianov D., Genova G., Parvanova D., Zapryanova N., Konstantinova T. and Atanasov A. (2005) *In vitro* culture of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80, 115-118.

Drazic G., Mihailovic N and Stevanovic B (1999) Chlorophyll metabolism in leaves of the higher poikilohydric plants *Ramonda serbica* Panc. And *R. nathaliae* Panc & Petrov. during dehydration and rehydration. *Journal of Plant Physiology* 154, 379-384.

Drennan P., Smith M., Goldsworthy D. and van Staden J. (1993) The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolia* Welw. *J. Plant Physiol.* 142, 493-496.

Dure L., Crouch M., Harada J., Ho T-H. D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T. and Shung Z. R. (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12, 475-486.

Eickmeier W. G. (1983) Photosynthetic recovery of the resurrection plant *Selaginella lepidophylla*: effects of prior desiccation rate and mechanism of desiccation damage. *Oecologia* 58, 115-120.

Ellis R. J. (1990) Molecular chaperones: the plant connection. *Science* 250, 954-966.

Elnitsky M. A., Benoit J. B., Denlinger D. L. and Lee R. E. (2008) Desiccation tolerance and drought acclimation in the Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus*. *Journal of Insect Physiology* 54, 1432-1439.

Esch J. J., Chen M., Sanders M., Hillestad M., Ndkium S., Idelkope B., Neizer J. and Marks M. D. (2003) A contradictory GLABRA3 allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis*. *Development* 130, 5885-5894.

Escobar A. M. and Dandekar M. A. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8 (8), 380-386.

Fabre E. and Dunal F. (1853) Observations sur les maladies regantesde la vigne. *Bull. Soc. Cent. Agric. Dep. Herault* 40, 46.

Farnsworth E. (2004) Hormones and shifting ecology throughout plant development. *Ecology* 85, 5–15.

Farrant J. M., Cooper K., Kruger L. A. and Sherwin H. W. (1999) The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species. *Annals of Botany* 84, 371–379.

Farrant J. M., Bailly C., Leymarie J., Hamman B., Come D. and Corbineau F. (2004) Wheat seedlings as a model to understand desiccation tolerance and sensitivity. *Physiologia Plantarum* 120 (4), 563-574.

Farrant J. M. (2000) A comparison of mechanisms of desiccationtolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology* 151, 29-39.

Feinberg A. P. and Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Annual Biochemistry* 132, 6-13.

Fischer E. (1992) Systematik der afrikanischen Lindernieae (*Scrophulariaceae*). Steiner, Stuttgart.

de Framond A. J., Barton K. A. and Chilton M. D. (1983) Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Bio/Technology* 1, 262-269.

Frank W., Munnik T., Kerkmann K., Salamini F. and Bartels D. (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, Plant *Cell* 12, 111-124.

Friedmann E. I. and Galun M. (1974) Desert algae, lichens and fungi. In: Brown G. W. Jr. (ed.) *Desert biology*. Academic Press, New York, pp. 165-212.

Furini A., Koncz C., Salamini F. and Bartels D. (1994) *Agrobacterium* mediated transformation of the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum. Plant Cell Reports* 14, 102-106.

Furini A., Koncz C., Salamini F. and Bartels D. (1997) High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *The EMBO Journal* 16 (12), 3599-3608.

Gaff D. F. (1972) Drought resistance in *Welwitschia mirabilis* HOOKER fil. *Dinteria* 7, 3-7.

Gaff D. E. and Churchill D. M. (1976) *Borya nitida* Labill. – an Australian species in the *Liliaceae* with desiccation tolerant leaves. *Australian Journal of Botany* 24, 209-224.

Gaff D.F. (1977) Desiccation tolerant vascular plants of Southern Africa. *Oecologia* 31, 95-109.

Gaff D. F. and Latz P. K. (1978) The occurrence of resurrection plants in the Australian flora. *Australian Journal Botany* 26, 485-492.

Gaff D. F., McGregor G. R. (1979) Effect of dehydration and rehydration on the nitrogen-content of various fractions from resurrection plants. *Biologia Plantarum* 21 (2), 92-99.

Gaff D. F. (1980) Protoplasmatic tolerance of extreme stress. In: Turner N. C. and Kramer P. J. (eds) Adaptation of plants to water and high tempreture stress, Jhon Wiley & Sons, New York, pp. 207-230.

Gaff D. F. (1981) The biology of resurrection plants. In: Pate J. S. and McComb A. J. (eds) *The biology of australian plants*. University of Western Australia Press, Nedlands, pp. 114-146.

Gaff D. F. and Loveys B. R. (1984) Abscisic acid content and effects during dehydration of detached leaves of desiccation tolerant plants. *Journal of Experimental Botany* 35, 1350-1358.

Gaff D. F. and Bole P. V. (1986) Resurrection grasses in India. *Oecologia* 71, 159-160.

Gaff D. E. and Giess W. (1986) Drought resistance in water plants in rock pools of southern Africa. *Dinteria* 18, 17-37.

Gaff D. F. (1987) Desiccation tolerant plants of Southern Africa. *Oecologia* 74, 133-136.

Gaff D. F. and Sutaryono Y. A. (1991) Grasses with complete desiccation tolerance. In: Proceedings of IVth International Rangeland Congress, French Grasslands Society, Montpellier, France, pp. 266-267.

Galau G. A. and Hughes D. W. (1987) Coordinate accumulation of homologous transcripts of seven cotton *lea* gene families during embriogenesis and germination. *Developmental Biology* 123, 213-221.

Garwe D., Thomson J. A. and Mundree S. G. (2003) Molecular characterization of *XVSAP1*, a stress-responsive gene from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker, *Journal of Experimental Botany* 54, 191-201.

Garwe D., Thomson J. A. and Mundree S. G. (2006) XVSAP1 from *Xerophyta viscosa* improves osmotic-, salinity- and high-temperature-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Biotechnology Journal* 1, 1137-1146.

Gelvin S. B. (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 223-256.

Georgieva K., Szigeti Z., Sarvari É., Gaspar L., Maslenkova L., Peeva V.,·Peli E. and·Tuba Z. (2007) Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant *Haberlea rhodopensis* during dehydration and rehydration. *Planta* 225, 955-964.

Georgieva K., Lenk S. and Buschmann C. (2008) Responses of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis* to high irradiance. *Photosynthetica* 46 (2), 208-215.

Gildner B. S. and Larson D. W. (1992) Seasonal changes in photosynthesis in the desiccation-tolerant fern, *Polypodium virginianum. Oecologia* 89, 383-389.

Goodner B., Hinkle G., Gattung S., Miller N., Blanchard M., Qurollo B., Goldman B.S., Cao Y., Askenazi M., Halling C., Mullin L., Houmiel K., Gordon J., Vaudin M., Iartchouk O., Epp A., Liu F., Wollam C., Allinger M., Doughty D., Scott C., Lappas C., Markelz B., Flanagan C., Crowell C., Gurson J., Lomo C., Sear C., Strub G., Cielo C., and Slater S. (2001) Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294, 2323-2328.

Grill D., Tausz T. and De Kok L. J. (eds) (2001) Significance of glutathione in plant adaptation to the environment. *Plant Ecophysiology*, Vol. 2. Springer. ISBN: 1402001789

Gutierrez L., Conejero G., Castelain M., Guénin S., Verdeil J. L., Thomasset B. and Van Wuytswinkel O. (2006) Identification of new gene expression regulators specifically expressed during plant seed maturation. *Journal of Experimental Botany* 57 (9), 1919-1932.

Gutierrez L., Van Wuytswinkel O., Castelain M. and Bellini C. (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science.* 12 (7), 294-300.

Guyon P., Chilton M. D., Petit A., Tempe J. (1980) Agropine in null-type crown gall tumors - evidence for generality of the opine concept. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA-Biological Sciences* 77 (5), 2693-2697.

Hahn S. C., Tenhunen J. D., Popp P. W., Meyer A. and Lange O. L. (1993) Upland tundra in the foothills of the Brooks Range, Alaska: diurnal carbon dioxide exchange patterns of characteristic lichen species. *Flora* 188, 125-143.

Hamilton R. H. and Fall M. Z. (1971) The loss of tumor-inducing ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation high temperature. *Experientia* 27, 229-230.

Hartung W., Schiller P. and Dietz K-J. (1998) Physiology of Poikilohydric Plants. *Progress in Botany*, Vol. 59. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Hedderson N., Balsamo R. A., Cooper K. and Farrant J. M. (2009) Leaf tensile properties of resurrection plants differ among species in their response to drying. *South African Journal of Botany* 75, 8-16.

Hendry G. A. F. (1993) Oxygen, free radical processes and seed longevity. *Seed Science Research* 3, 141-153.

Hengherr S., Bruemmer F. and Schill R. O. (2008) Anhydrobiosis in tardigrades and its effects on longevity traits. *Journal of Zoology* 275 (3), 216-220.

Hideg E. (1996) Free radical production in photosynthesis under stress conditions. In: Pessarakli M. (ed.) *Handbook of photosynthesis.* Dekker, New York, pp. 911-930.

Hiei Y., Komari T. and Kubo T. (1997) Transformation of rice by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 35, 205-218.

Hille J., Wullems G. and Schilperoort R. (1983) Non-oncogenic T-region mutants of *Agrobacterium tumefaciens* do transfer T-DNA into plant cells. *Plant Molecular Biology* 2 (3), 155-163.

Hinton H. E. (1968) Reversible suspension of metabolism and the origin of life. *Proceedings of the Royal Society of London B* 171, 43-57.

Hoekema A., Hirsh P. R., Hooykaas P. J. J. and Schilperoort R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.

Hoekstra F. A., Crowe L. M. and Crowe J. H. (1989) Differential desiccation sensitivity of corn and *Pennisetum* pollen linked to their sucrose contents. *Plant Cell Environment* 12, 83-91.

Hooker W. J. (1837) *Icones Plantarum; or figures, brief descriptive characters and remarks on new or rare plants, selected from the authors herbarium*, Vol. 2. Longman, London, pp.162-163.

Horsch R., Fry J.., Hoffmann N, Neidermeyer J., Rogers S. and Fraley R. (1988) *Plant Molecular Biology Manual A5*, 1-9.

Hu T. Zh. (2008) *OsLEA3*, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice. *Russian Journal of Plant Physiology* 55 (4), 530-537.

Iljin W. S. (1957) Drought resistance in plants and physiological processes. *Annual Review of Plant Physiology* 3, 341-363.

Illing N., Denby K.J., Collett H., Shen A., Farrant J.M. (2005) The signature of seeds in resurrection plants: a molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integrative and Comparative Biology* 45, 771-787.

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

Iturriaga G., Gaff D. F. and Zentella R. (2000) New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico accumulate trehalose. *Austral Journal of Botany* 48, 153-158.

Iturriaga G., Cushman M. A. F. and Cushman J. C. (2006) An EST catalogue from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* reveals abiotic stress-adaptive genes. *Plant Science* 170, 1173-1184.

Jefferson R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reports* 5, 387-405.

Jefferson R. A., Kavanagh T. A. and Bevan M. (1987) GUS fusions: β- glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6, 3901-3907.

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

Jiang G., Wang Z., Shang H., Yang W., Hu Z., Phillips J. and Deng X. (2007) Proteome analysis of leaves from the resurrection plant *Boea hygrometrica* in response to dehydration and rehydration. *Planta* 225, 1405-1420.

Jinn T. L., Wu S. H., Yeh C. H., Hsieh M. H., Yeh Y. C., Chen Y. M. and Lin C. Y. (1993) Immunological kinship of class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins *in vitro* among plants. *Plant & Cell Physiology* 34, 1055-1062.

Jones L. and McQueen-Mason S. (2004) A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *FEBS Letters* 559, 61-65.

Kalemba E. M. and Pukacka S. (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biological Letters* 44(1), 3-16.

Kamisugi Y. and Cuming A. C. (2005) The evolution of the Abscisic acid-response in land plants: comparative analysis of Group 1 LEA gene expression in moss and cereals. *Plant Molecular Biology* 59, 723–737.

Kappen L. (1964) Untersuchungen über die Jahreslauf der Frost-, Hitze- und Austrocknungsresistenz von Sporophyten einheimischer Polypodiaceen. *Flora* 155, 123-166.

Kappen L., Lange O. L., Schulze E. D., Buschbom U. and Evenari M. (1980) Ecophysiological investigation on lichens of the Negev desert. 6. Annual course of photosynthetic production of *Ramalina maciformis* (Del.) Bory. *Flora* 169, 216-229.

Kappen L. and Valladares F. (1999) Opportunistic growth and desiccation tolerance: the ecological success of poikilohydrous autotrophs. In: Pugnaire F. I. and Valladares F. (eds) *Handbook of Functional Plant Ecology*. Marcel Dekker, New York, pp. 10-80.

Keilin D. (1959) The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London B* 150, 149-199.

Kerr A. (1971) Aquisition of virulence by non pathogenic isolates of *Agrobacterium radiobacter. Physiological Plant Pathology* 1, 241-246.

Klee H., Montoya A., Horodyski F., Lichtenstein C., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Peschon J., Nester E. and Gordon M. (1984) Nucleotide sequence of the *tms* genes of the pTiA6NC octopine Ti plasmid: 2 gene-products involved in plant tumorigenesis. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81 (6): 1728-1732.

Kleines M., Elster R. C., Rodrigo M. J., Blervacq A. S., Salamini F. and Bartels D. (1999) Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 209, 13-24.

Koncz C., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Reiss B., Redei G. P. and Schell J. (1990) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 9, 1337-1346.

Koncz Cs. és Rédei Gy. (2001) A molekuláris genetika eszközei: *Agrobacterium* T-DNS és *Arabidopsis* In: Balázs E. Dudits D. (eds) *Molekuláris növénynemesítés*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 327-452.

Koster K. L. (1991) Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 96, 302-304.

Kotchoni S. O., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H. H. and Bartels D. (2006) Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants againts lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant Cell Environment* 29, 1033-1048.

Kranner I., Beckett R. P., Wornik S., Zorn M. and Pfeifhofer H. W. (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal* 31, 13-24.

Kranner I. and Birtic S. (2005) A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45, 734-740.

Kuang J., Gaff D. F., Gianello R. D., Blomstedt C. K., Neale A. D. and Hamill J. D. (1995) Changes in *in vivo* protein complements in drying leaves of the desiccation tolerant grass *Sporobolus stapfianus* and the desiccation sensitive grass *Sporobolus pyramidalis*. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 1027-1034.

Kubitzki K. (1998) Velloziaceae. In: Kubitzki K. (ed.) *The Families and Generae of Vascular Plants*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 459-467.

Leemans J., Deblaere R., Willmitzer L., Degreve H., Hernalsteens J. P., Van Montagu M. and Schell J. (1982) Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls. *Embo Journal* 1 (1), 147-152.

Leopold A. C. and Vertucci C. W. (1986) Physical attributes of dessicated seeds. In: Leopold A. C. (ed.) *Membrans, metabolism and dry organisms*, Cornell University Press, Ithaca, pp. 22-34.

Leprince O., Hendry G. A. F. and McKersie B. D. (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3, 231-46.

Levitt J. (1980) Responses of plants to environmental stresses, vol 2. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, New York.

Lin T. P. and Huang N. H. (1994) The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 45, 1289-1294.

Lioret C. (1956) Sur la mise en evidence d'un acide amine non identifie particulier aux tissus de 'crown-gall'. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg*. 2, 76.

Liu D., Zhang X., Cheng Y., Takano T. and Liu S. (2006) *rHsp90* gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 380-386.

Liu X., Wanga Z., Wanga L., Wua R., Phillips J. and Deng X. (2009) LEA 4 group genes from the resurrection plant *Boea hygrometrica* confer dehydration tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science* 176, 90-98.

Lloyd G. B. and McCown B. H. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society* 30: 421-427.

Mariaux J-B., Bockel C., Salamini F. and Bartels D. (1998) Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum. Plant Molecular Biology* 38, 1089-1099.

Markovska Y. K., Tsonev T. D., Kimenov G. P. and Tutekova A. A. (1994) Physiological changes in higher poikilohydric plants *Haberlea rhodopensis* Friv. and *Ramonda serbica* Panè. during drought and rewatering at different light regimes. *Journal of Plant Physiology* 144, 100–108.

Mauch-Mani B. and Mauch F. (2005) The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 409–414.

Meng Y., Patel G., Heist M., Betts M. F., Tucker S. L., Galadima N., Donofrio N. M., Brown D., Mitchell T. K., Li L., Xu J., Orbach M., Thon M., Dean R. A. and Farman M. L. (2007) A systematic analysis of T-DNA insertion events in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 44, 1050-1064.

Michel D., Furini A., Salamini F. and Bartels D. (1994) Structure and regulation of an ABA- and desiccation-responsive gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 24, 549-560.

Mishler B. D. and Churchill S. P. (1985) Transition to a land flora: phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *Cladistics* 1, 305-328.

Moore J. P., Le N. T., Brandt W. F., Driouich A. and Farrant J. M. (2009) Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 14 (2) 110-117.

Mowla S. B., Thomson J. A., Farrant J. M. and Mundree S. G. (2002) A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Planta* 215, 716–726.

Mundree S. G., Baker B., Mowla S., Peters S., Marais S., Willigen C. V., Govender K., Maredza A., Muyanga S., Farrant J. M. and Thomson J. A. (2002) Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology* 1, 28-38.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth requirements of tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15, 473-449.

Müller J., Sprenger N., Bortlik K., Boller T. and Wiemkien A. (1997) Desiccation increases sucroses levels in *Ramonda* and *Haberlea*, two genera of resurrection plants in the Gesneriaceae. *Physiologia Plantarium* 100, 153-158.

Navari-Izzo F., Pinzino C., Quartacci M. F., Sgherri C. L. M. and Izzo R. (1994) Intracellular membranes: kinetics of superoxide production and changes in thylakoids of resurrection plants upon dehydration and rehydration. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B (Biological Sciences)* 102B, 187-91.

Navari-Izzo F., Quartacci M. F. and Sgherri C. L. M. (1997) Desiccation tolerance in higher plants related to free radical defences. *Phyton* 37, 203-214.

Neale A. D., Blomstedt C. K., Bronson P., Le T-N., Guthridge K., Evans J., Gaff D. F. and Hamill J. D. (2000) The isolation of genes from the resurrection grass *Sporobolus stapfianus* which are induced during severe drought stress. *Plant, Cell and Environment* 23, 265-277.

Niedzwiedz-Siegien I., Bogatek-Leszczynska R., Come D. and Corbineau F. (2004) Effects of drying rate on dehydration sensitivity of excised wheat seedling shoots as related to sucrose metabolism and antioxidant enzyme activities. *Plant Science* 167, 879-888.

Nobel P. S. (1978) Microhabitat, water relations and photosynthesis of a desert fern, *Notholaena parryi. Oecologia* 31, 293-309.

Norwood M., Truesdale M. R., Richter A. and Scott P.(2000) Photosynthetic carbohydrate metabolism in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. *Journal of Experimental Botany* 51, 159-165.

Norwood M., Toldi O., Richter A. and Scott P. (2003) Investigation into the ability of roots of the poikilohydric plant *Craterostigma plantagineum* to survive dehydration stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 2313-2321.

Oliver M. J. and Bewley J. D. (1997). Desiccation tolerance of plant tissues: A mechanistic overview. *Horticultural Reviews* 18: 171-213.

Oliver M. J., Tuba Z. and Mishler B. D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151, 85-100.

Oliver M. J., Dowd S. E., Zaragoza J., Mauget S. A. and Payton P. R., (2004) The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics* 5, 89.

Oppenheimer H. R. and Halevy A. (1962) Anabiosis of *Ceterach officinarum* Lam. Et. DC. *Bulletin of the Research Council of Israel* D3 11, 127-147.

Öktem H. A., Eyidogan F., Ertugrul F., Yücel M., Jenes B. and Toldi O. (1999) Marker gene delivery to mature wheat embryos via particle bombardment. *Turkish Journal of Botany* 23, 303-308.

Peeva V. and Cornic G. (2009) Leaf photosynthesis of *Haberlea rhodopensis* before and during drought. *Environmental and Experimental Botany* 65, 310-318.

Peng H., Huang H., Yang Y., Zhai Y., Wu J., Huang D. and Lu T. (2005) Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science* 168, 1571-1579.

Pereira A. (2000) A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Research* 9, 245-260.

Pessin L. J. (1924) A physiological and anatomical study of the leaves of *Polypodium polypodioides*. *American Journal of Botany* 11, 370-381.

Peters S., Mundree S. G., Thomson J. A., Farrant J. M. and Keller F. (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58, 1947-1956.

Phillips J. R., Hilbricht T., Salamini F. and Bartels D. (2002) A novel abscisic acid- and dehydration-responsive gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encodes a plastid-targeted protein with DNA-binding activity. *Planta* 215, 258-266.

Phillips J. R., Dalmay T. and Bartels D. (2007) The role of small RNAs in abiotic stress. *FEBS Letters* 581, 3592-3597.

Pico F. X., Möller M., Ouborg N. J. and Cronk Q. C. B. (2002) Single nucleotide polymorphisms in the coding region of the developmental gene *Gcyc* in natural populations of the relict *Ramonda myconi* (*Gesneriaceae*). *Plant Biology* 4, 625-629.

Porembski S. and Barthlott W. (2000) Granitic and gneissic outcrops (iselbergs) as center of diversity for desiccation tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151, 19-28.

Proctor M. C. F. (1990) The physiological basis of bryophyte production. *Botanical Journal of the Linnean Society* 104, 61-77.

Proctor M. C. F., Nagy Z., Csintalan Zs. and Takács Z. (1998) Water-content components in bryophytes: analysis of pressure-volume relationships. *Journal of Experimental Botany*, 49, 1845-1854.

Proctor M. C. F. and Pence V. C. (2002) Vegetative tissues: bryophytes, vascular ressurection plants and vegetative propagules. In: Black M. and Pritchard H. W. (eds) *Desiccation and survival in plants*, CABI Publishing, New York, pp. 207-237.

Proctor M. C. F. and Tuba Z. (2002) Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities? *New Phytologist* 156 (3), 327-349.

Proctor M. C. F. (2003) Comparative Ecophysiological Measurements on the Light Responses, Water Relations and Desiccation Tolerance of the Filmy Ferns *Hymenophyllum wilsonii* Hook. and *H. tunbrigense* (L.) Smith. *Annals of Botany* 91, 717-727.

Reynolds T. L. and Bewley (1993) Abscisic acid enhances the ability of the desiccation tolerant fern, *Polypodium virginianum* to withstand drying. *Journal of Experimental Botany* 44, 1771-1779.

Richardson D. H. S. (1981) *The biology of mosses*. Balckwell Scientific, New York.

Roberts J. K., DeSimone N. A., Lingle W. L. and Dure L. (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5, 769-780.

Rodrigo M. J., Bockel C., Blervacq A. S., and Bartels D. (2004) The novel gene *CpEdi-9* from the resurrection plant *C. plantagineum* encodes a hydrophilic protein and is expressed in mature seeds as well as in response to dehydration in leaf phloem tissues. *Planta* 219, 579-589.

Röhrig H., Schmidt J., Colby T., Bräutigam A., Hufnagel P. and Bartels D. (2006) Desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* induces dynamic changes in protein phosphorylation. *Plant, Cell and Environment* 29, 1606–1617.

Sabovljevic A., Sabovljevic M., Rakic T. and Stevanovic B. (2008) Establishment of procedures for *in vitro* maintenance, plant regeneration, and protoplast transfection of the resurrection plant *Ramonda serbica. Belgian Journal of Botany* 141 (2), 178-184.

Sales K., Brandt W., Rumbak E. and Lindsey G. (2000) The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cervisiae* has a plasma membran location and protects membrans against desiccation and ethanol-iduced stress. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 1463, 267-278.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniathis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sato Y. and Yokoya S. (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants over expressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports* 27, 329-334.

Schierbeek A. (1959) Measuring the Invisible World. Abelard-Schuman, London.

Schill R. O. and Fritz G. B. (2008) Desiccation tolerance in embryonic stages of the tardigrade. *Journal of Zoology* 276 (1), 103-107.

Schiller P., Hartung W. and Ratcliffe R. G. (1997) A stress–physiological ^{31}P-NMR study of the aquatic resurrection plant *Chamaegigas intrepidus. Journal of Experimental Botany* 48: supp. l41.

Schiller P., Heilmeier H. and Hartung W. (1998) Uptake of amino acids by the aquatic resurrection plant *Chamaegigas intrepidus* and its implication for N nutrition. *Oecologia* 117, 63-69.

Schiller P., Wolf R.. and Hartung W. (1999) Intracellular pH stability in the aquatic resurrection plant *Chamaegigas intrepidus* in the extreme environmental conditions that characterize its natural habitat. *New Physiologist* 140, 1-7.

Schmidt J. E. and Kaiser W. M. (1987) Response of the succulent leaves of *Peperomia magnoliaefolia* to dehydration. *Planta* 83, 190-194.

Schroeter B., Green T. G. A., Kappen L. and Seppelt R. D. (1994) Carbon dioxid exchange at subzero temperatures. Field measurements on *Umbilicaria aprina* in Antartica. *Cryptogamic Botany* 4, 223-241.

Schwab K. B. (1986) Morphologische, physiologische und biochemische Anpassungsstrategien austrocknungstoleranter höherer Pflanzen. PhD thesis, University of Würzburg.

Schwab K. B., Schreiber U. and Heber U. (1989) Response of photosynthesis and respiration of resurrection plants to desiccation and rehydration. *Planta* 177 (2), 217-227.

Schwall G., Elster R., Ingram J., Bernacchia G., Bianchi G., Gallagher L., Salamini F. and Bartels D. (1995) Carbohydrate metabolism in the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. In: Pontis HG, Salerno GL and Echeverria EJ (eds) *International Symposium on Sucrose Metabolism*. Copyright, American Society of Plant Physiologists, pp. 245-251.

Scott P (2000) Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany* 85, 159-166.

Senthil-Kumar M. and Udayakumar M. (2006) High-throughput virus-induced gene-silencing approach to assess the functional relevance of a moisture stress-induced cDNA homologous to *lea4*. *Journal of Experimental Botany* 57 (10), 2291-2302.

Sgherri C. L. M., Loggini B., Puliga S. and Navi-Izzo F. (1994) Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry* 35, 561-565.

Shannon A. J., Tyson T., Dix I., Boyd J. and Burnell A. M. (2008) Systemic RNAi mediated gene silencing in the anhydrobiotic nematode *Panagrolaimus superbus*. *BMC Molecular Biology* 9, 58.

Shaw C. H. (1991) Swimming against the tide – chemotaxis in *Agrobacterium*. *Bioessays* 13 (1), 25-29.

Sheng J. and Citovsky V (1996) *Agrobacterium* – plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* 8, 1699-1710.

Shen-Miller J., Schopf J.W., Harbottle G., Cao R., Ouyang S., Zhou K., Southon J.R., Liu G. (2002) Long-living lotus: germination and soil g-irradiation of centuries-old fruits, and cultivation, growth, and phenotypic abnormalities of offspring. *American Journal of Botany* 89, 236-247.

Sherwin H. W., Berjak P., Farrant J. M. and Pammenter N. W. (1995) The importance of critical cell volume and cell wall elasticity in the ability to withstand desiccation. In : Belhassan E., Schlicht F., Cuellar T. and Lewicki S. (eds). *Integrated study on drought tolerance of higher plants*. INRA, Paris.

Sherwin H. W. and Farrant J. M. (1998) Protection mechanisms against excess light in three resurrection plants *Craterostigma wilmisii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation* 24, 203-210.

Siljak-Yakovlev S., Stevanovic V., Tomasevic M., Brown S. C. and Stevanovic B. (2008) Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*:

Cytogeography of living fossils. *Environmental and Experimental Botany* 62, 101-112.
Smirnoff N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*. 125, 27-58.
Smith E. F. and Townsend C. O. (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 24, 671-673
Smith-Espinoza C. J., Phillips J. R., Salamini F. and Bartels D. (2005) Identification of further *Craterostigma plantagineum* cdt mutants affected in abscisic acid mediated desiccation tolerance. *Molecular Genetics and Genomics* 274, 364-372
Smith-Espinoza C. J., Bartels D. and Phillips J. (2007) Analysis of a LEA gene promoter via *Agrobacterium*-mediated transformation of the desiccation tolerant plant *Lindernia brevidens*. *Plant Cell Reports* 26, 1681-1688.
Spickett C. M., Smirnoff, N. and Ratcliffe, R. G. (1992) Metabolic response of maize roots to hyoerosmotic shock. An *in vivo* ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *Plant Physiology* 99, 856-863.
Stachel S. E. and Zambrisky P. C. (1985) VirA and VirG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens. Cell* 46, 325-333.
Strauss G., and Hauser H. (1986) Stabilization of lipid bilayer vesicles by sucrose during freezing. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2422-2426.
Stuart T. S. (1968) Revival of respiration and photosynthesis in dried leaves of *Polypodium polypodioides. Planta* 83, 185-206.
Sutaryono Y. A. and Gaff D. F. (1992). Grazing potential of desiccation tolerant tropical and subtropical grasses. *Trans Malaysian Society of Plant Physiology* 3, 180-183.
Sváb J. (1981) Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.
Thomson J. W. and Iltis H. H. (1968) A fog-induced lichen community in the coastal desert of southen Peru. *Bryologist* 71, 31-34.
Timmermans M. C. P., Maliga P., Viera J. and Messing J. (1990) The pFF plasmid: casettes utilizing CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *Journal of Biotechnology* 14, 333-344.
Toldi O., Gyulai G., Preininger E., Varallyay E., Fari M. and Balazs E. (1994) Minibeet initiation from derooted sugar-beet (*Beta Vulgaris* L.) seedlings *in vitro. Plant Science* 97 (2), 217-224.
Toldi O., Tóth S., Pónyi T. and Scott P. (2002) An effective and reproducible transformation protocol for the model resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Cell Reports* 21, 63-69.
Toldi O., Djilianov D. and Scott P. (2006) Transgenic approach for functional analysis of genes associated with desiccation tolerance in resurrection plants, in: J.A. Teixeira da Silva (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, vol. III, Global Science Book, UK, 209-217.
Toldi O., Tuba Z. and Scott P. (2009) Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops? *Plant Science* 176, 187-199.
Tóth S., Scott P., Sorvari S. and Toldi O. (2004) Effective and reproducible protocols for *in vitro* culturing and plant regeneration of the physiological model plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Science* 166, 1027-1034.
Tóth S., Kiss C., Scott P., Kovács G., Sorvari S. and Toldi O. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the desiccation tolerant resurrection plant *Ramonda myconi* (L.) Rchb. *Plant Cell Reports* 25, 442-449.

Tuba Z., Lichtenthaler H. K., Maroti I. and Csintalan Zs. (1993) Resynthesis of thylakoids and functional chloroplasts in the desiccated leaves of the poikilochlorophyllous plant *Xerophyta scabida* upon rehydration. *Journal of Plant Physiology* 142, 742-748.

Tuba Z., Proctor M. C. F. and Csintalan Z. (1998) Ecophysiological responses of homoioclorophyllus and poikiloclorphyllus desiccation tolerant plants: a comparison and ecological perspective. *Plant Growth Regulation* 24, 211-217.

Tuba Z. (2002) A trópusi sziklakiemelkedések (inselbergek) növényzete és szerepe az edényes növények kiszáradástűrésének evolúciójában. In: Magyar botanikai kutatások az ezredfordulón, tanulmányok Borhidi Attila 70. születésnapja tiszteletére, PTE Növénytani Tanszék, Pécs, pp. 513-523.

Tuba Z. (2008) Notes on the poikilochlorophyllous desiccation-tolerant plants. *Acta Biologica Szegediensis* 52 (1), 111-113.

Tunnacliffe A. and Lapinski J. (2003) Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 358, 1755-1771.

Tzfira T. and Citovsky V. (2002) Partners-in-infection: host protein involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium. Trend in Cell Biology* 12, 121-128.

Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L. and Rocha-Sosa M. (1990) Construction of an intron containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics* 220, 245-250.

Vander Willigen C., Mundree S. G., Pammenter N. W. and Farrant J. M. (2003). An ultrastructural study using anhydrous fixation of *Eragrostis nindensis*, a resurrection grass with both desiccation-tolerant and –sensitive tissues. *Functional Plant Biology* 30, 281-290.

Velasco R., Salamini F. and Bartels D. (1998) Gene structure and expression analysis of the drought- and abscisic acid-responsive *CDeT11-24* gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 204, 459-471.

Vertucci C. W and Farrant J. M (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J. and Galilli G. (eds) *Seed Development and Germination*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 237-271.

Vicre M., Sherwin H. W., Driouich A., Jaffer M. A. and Farrant J. M. (1999) Cell wall characteristics and structure of hydrated and dry leaves of the resurrection plant Craterostigma wilmsii, a microscopical study. *Journal of Plant Physiology* 155, 719-726.

Vierling E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 579-620.

Villalobos M. A., Bartels D. and Iturriaga G. (2004) Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. *Plant Physiology* 135, 309-324.

Volk O. H. (1984) Pflanzenvergesellschaftungen mit *Riccia*-Arten in Südwestafrika (Namibia). *Vegetatio* 55, 57-64.

Wang H., Qi Q. G., Schorr P., Cutler A. J., Crosby W. L. and Fowke L. C. (1998) ICK1, a cyclindependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant Journal* 15, 501–510.

Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. and Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9, 244-252.

Waters E. R., Lee G. J. and Vierling E. (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47, 325-338.

Weiler E. W. (1980) Radioimmunoassaya for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 148, 262-272.

Wehmeyer N., Hernandez L. D., Finkelstein R. R. and Vierling E. (1996) Synthesis of small heat shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* 112, 747-757.

Wilkinson S. and Davies W. J. (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environment* 25, 195-210.

Williams R. J. and Leopold A. C. (1989) The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology* 89, 977–981.

Wilson A. T., Vickers M. and Mann L. R. B. (1979) Metabolism in dry pollen – a novel technique for studying anhydrobiosis. *Naturwissenschaften* 66, 53-54.

Wise M. J. and Tunnacliffe A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9**,** 13-17.

Wood A. J., Duff R. J. and Oliver M. J. (1999) Expressed sequence tags (ESTs) from dessicated *Tortula ruralis* identify a large number of novel plant genes. *Plant Cell Physiology* 40, 361-368.

Wu X., Shiroto Y., Kishitani S., Ito Y. and Toriyama K. (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter. *Plant Cell Reports* 28, 21-30.

Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T-H. D. and 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.

Yahubyan G., Gozmanova M., Denev I., Toneva V. and Minkov I. (2009) Prompt response of superoxide dismutase and peroxidase to dehydration and rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Plant Growth Regulation* 57, 49-56.

Zaenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M. and Schell J., (1974) Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology* 86, 109-127.

Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Vanmontagu M., and Schell J. (1983) Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant-cells without alteration of their normal regeneration capacity. *Embo Journal* 2 (12), 2143-2150.

Zambryski C. P. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium* – plant cell DNA transfer story. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 465-490.

Zou J., Liu A., Chen X., Zhou X., Gao G., Wang W. and Zhang X. (2009) Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *Journal of Plant Physiology* doi:10.1016/j.jplph.2008.11.007

Zupan J., Muth T. R., Draper O. and Zambryski P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal* 23 (1), 11-28.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Toldi Ottó konzulensemnek, aki töretlenül bízott bennem, akkor is, amikor a körülmények alakulása kétségessé tette a munka folytatását. Köszönöm, hogy alkalmazkodva a kialakult szokatlan helyzethez, segített a kísérletek tervezésében, kivitelezésében és az eredmények tudományos nyelven való megfogalmazásában.

A munkában résztvevő külföldi partnerek, Dr. Peter Scott (Anglia, University of Sussex) és Dr. Seppo Sorvari (Finnország, Agricultural Research Center of Finland) áldozatos munkájukkal és szakmai tanácsaikkal nagyban hozzájárultak a munkám sikeréhez.

A molekuláris munkák kivitelezésében Dr. Kovács Gabriellának és Dr. Pónyi Tamásnak tartozom köszönettel.

Az, hogy a doktori munkámhoz mindvégig biztosítva voltak a megfelelő laboratóriumi körülmények jelentős részben Dr. Jenes Barnabás nagylelkű támogatásán múlott, amiért mindig hálás leszek.

Két szakdolgozó, Bialkó Ágnes és Kiss Csaba, aktív munkája a laboratóriumi kísérletek folyamatos kivitelezésében jelentős segítség volt, amiért köszönettel tartozom nekik.

Köszönettel tartozom Kaszta Karolinának a laboratóriumban és Kaszta Miklósnak az üvegházban végzett áldozatos és pontos munkájáért.

A cikkeimben és a dolgozatomban látható valamennyi fotót Takács Gábor készítette, aki megalkuvást nem ismerő precizitással és alapossággal járt el minden esetben, köszönet érte.

Köszönöm feleségemnek, hogy a sokszor hétvégén és éjszaka végzett kísérletek ellenére türelmesen kitartott mellettem és bízott a munkám sikerében. És az időközben megszületett két kis lurkónak, akik puszta létükkel inspiráltak a munkára.

Köszönöm a szüleim támogatását, akik hosszúra nyúlt tanulóéveim alatt is bíztak bennem.