SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

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	**Dr. Toldi Ottó**
doktori iskola vezető	**témavezető**

BEVEZETÉS ÉS KITŰZÖTT CÉLOK

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 enyíthetnénk 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.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Növényanyag

A *C. plantagineum* növényeket Prof. Dr. Dorathea Bartels bocsátotta rendelkezésünkre (Németország, Köln, Max Plank Institute), aki eredetileg Namibiában gyűjtötte azokat. A felszínsterilizált leveleket hormonmentes táptalajt tartalmazó műanyag konténerekbe (Duchefa Biochemie) helyeztük, amelyeket fényszobában 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódus mellett 24 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.

A kísérletekhez használt *R. myconi* terméseket dísznövénykertészetből szereztük be Angliából. 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 ºC-on tartottuk. A növényeket 3-4 hetente passzáltuk. Az elöregedett, elhalt részeket a passzálás során eltávolítottuk.

Kalluszindukció és növényregenerálás

A gyorsan fejlődő, egészséges mikroszaporított *C. plantagineum* növényekről származó levelekből kb. 5x7 mm nagyságú explantumokat vágtunk ki úgy, hogy a levélszegmensnek legalább három vágott éle legyen. Ezeket az explantumokat kallusz indukciós táptalajra (CI, kallusz indukáló táptalaj) helyeztük. A Petri csészéket fényszobába helyeztük, 16 h fény (kb. 1000 lx) / 8 h sötét fotoperiódus mellett 24 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. A Petri csészéket fényszobába helyeztük 16 h fény (kb. 4500 lx) / 8 h sötét fotoperiódus mellett 24 ºC-ra. A kalluszok felszínén kb. 1 hónap elteltével hajtások jelentek meg, amelyekből egészséges növények fejlődtek.

A *R. myconi* kalluszosítási kísérletek beindításához a kiindulási alapanyagból középkorú egészséges leveleket válogattunk, amelyekből 4x6 mm nagyságú szegmenseket vágtunk ki. Ezeket az explantumokat olyan RA táptalajra helyeztük, amely 0,2 mg/l BAP-ot és 2 mg/l picloramot tartalmazott. 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 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.

***Agrobacterium tumefaciens* 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. Ez a beépített intron biztosította, hogy a *gus* gén csak a növényekben fejeződjön ki.

Genetikai transzformáció

A transzformációhoz a kalluszosításnál leírtak szerint indítottunk *C. plantagineum* 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.

A transzformációhoz a kalluszosításnál leírtak szerint indítottunk *R. myconi* 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.

Genetikai transzformáció bizonyítása

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 reakcióban 1500 bp hosszúságú *gus* fragmentum amplifikáltunk, míg *R. myconi* esetében az *nptII* génre specifikus fragmentumot (750 bp) amplifikáltunk.

A Southern analízishez a *C. plantagineum* és a *R. myconi* esetében is a 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.

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 ºC-os termoblokkon inkubálva végeztük.

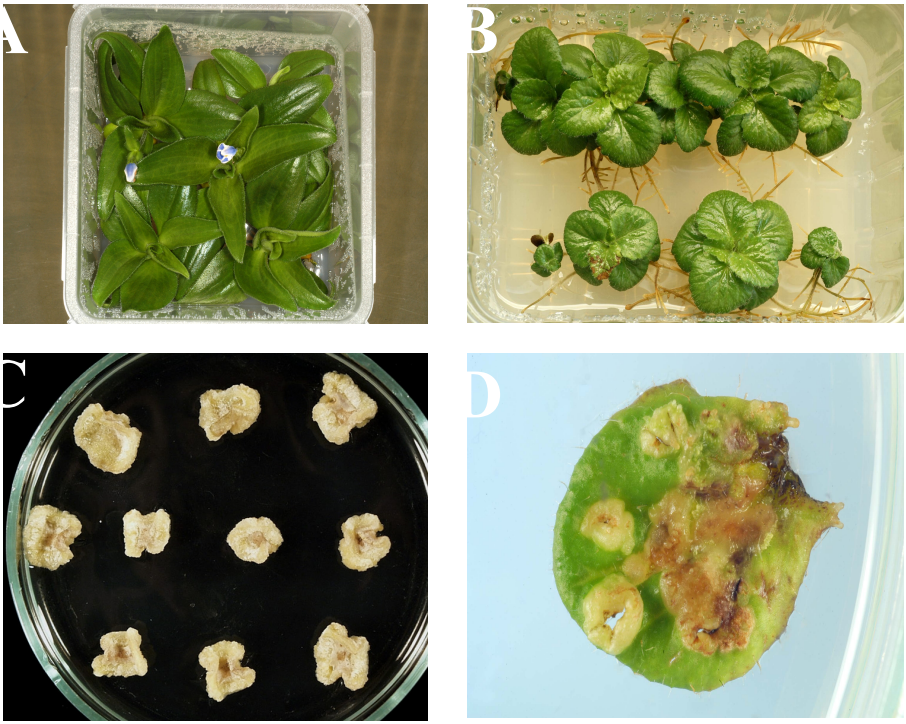
Statisztikai analízis

A vizsgálatokat minden esetben több ismétlésben végeztük (legtöbbször 3-5-szöri ismétlésben). Az adatokat középérték analízissel értékeltük ki, a szórásokat pedig a középértékek eltéréséből számítottuk ki (Sváb, 1981).

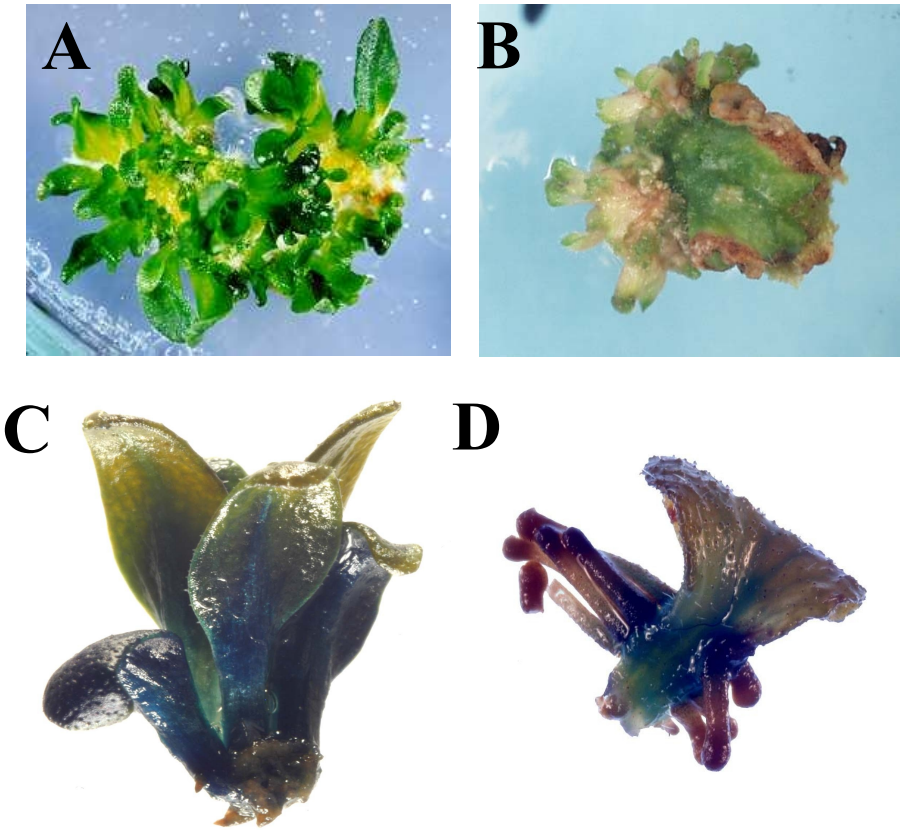
EREDMÉNYEK

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 (1. ábra, A, B), kalluszosításukhoz (1. ábra, C, D) és a regenerációjukhoz (2. ábra, A, B) 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 (1. ábra, A, B).



1. ábra (A) *Craterostigma plantagineum* mikroszaporító táptalajon. (B) *Ramonda myconi* mikroszaporító táptalajon. (C) *C. plantagineum* kalluszfejlődése. (D) *R. myconi* kalluszfejlődése a tűvel okozott sérülések körül.



2. ábra (A) *Craterostigma plantagineum* növények regenerációja kalluszból. (B) *Ramonda myconi* növények regenerációja kalluszból. (C) Genetikai transzformáció bizonyítása GUS festéssel *C. plantagineum* esetében. (D) Genetikai transzformáció bizonyítása GUS festéssel *R. myconi* esetében.

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 (1. ábra, C, D).

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 (2. ábra, A, B).

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 nyílvánvalóvá 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 (2. ábra, C, D), PCR analízissel és Southern-blot analízissel igazoltuk a transzgén jelenlétét és működését.

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 kibocsájtásának 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.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

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.

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.

IRODALOMJEGYZÉK

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.

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

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.

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.

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

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

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.

Sváb J. (1981) Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

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.

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.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Tudományos publikációk folyóiratokban:

Tóth S., Kiss Cs., 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. (IF 1,727)

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(4), 1027-1034. (IF 1,389)

Toldi O., **Tóth S.,** Pónyi T. and Scott P. (2002) An efficient and reproducible genetic transformation protocol for the model resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hoscht. **Plant Cell Reports** 21(1), 63-69. (IF 1,340)

Absztraktok:

Toldi O., Norwood M., **Tóth S.,** Jenes B. and Scott P. (2001) An efficient and reproducible method for *Agrobacterium*-mediated transformation of the physiological model plant *Craterostigma plantagineum.* **Journal of Experimental Botany** Vol. 52., p. 52.

Toldi O., Norwood M., **Tóth S.** and Scott P (2000) The susceptibility to *Agrobacterium*-mediated transformation in the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* is determined by *in vitro* preinduction of *vir* genes of the bacterial *Ti* plasmid. **Plant Physiology and Biochemistry** Vol. 38., p. 97.

Toldi O., Norwood M., **Tóth S.** and Scott P (2000) The susceptibility to *Agrobacterium*-mediated transformation in the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* is determined by *in vitro* preinduction of *vir* genes of the bacterial *Ti* plasmid. *12th International Conference of the Federation of European Societies of Plant Physiology, 21-25 August, Budapest, Hungary.* In: Plant Physiology and Biochemistry Special Issue, Elsevier.

Egyéb publikációk:

Toldi O, Ahanen K, Kovacs G, Sorvari S, **Tóth S**, Dulai S, Scott P (2005) Integrated application of physiological and molecular methods to forecast determinative morphogenetic events in tissue cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L. Cv Samsun) leaf discs. **Plant Growth Regulation** 47 (1), 59-64. (IF 0,841)

Toldi O., **Tóth S.**, Oreifig A.S., Kiss E. and Jenes B. (2000) Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through application of phosphinothricin as growth regulator. **Plant Cell Reports** 19(12), 1226-1231. (IF 1,277)

Könyvfejezet:

Toldi O, **Tóth S,** Oreifig AS Kiss E and Jenes B (2000) Production of herbicide tolerant rice by *in vitro* selection. In: Hrazdina G (ed) **Use of Agriculturally Important Genes in Biotechnology**. NATO Science Series Vol. 319., IOS Press, Washington DC, US., p. 153-159.
Absztraktok:

Absztraktok:

Toldi O., **Tóth S.,** Oreifig A. S., González A. S., Kiss E. and Jenes B. (1999) Phosphinotricin: a herbicide or a synthetic cytokinin? **Journal of Experimental Botany** Vol. 50., p. 56

Jenes B., Toldi O., Pauk J., Oreifig A.S., **Tóth S.,** Sági F., Dallmann G. and Balázs E. (1998) Genetic engineering of wheat to improve tolerance against dehydration stress. *XVth EUCARPIA General Congress, 20-25 September, Viterbo, Italy. In: Abstract Book, p.106*

Toldi O., **Tóth S.** Oreifig A.S., González A.S., Kiss E. and Jenes B. (1999) Phosphinotricin: a herbicide or a synthetic cytokinin? *Annual Meeting Of The Society For Experimental Biology, 22-26 March, Edinburgh, Great Britain. In: Programme, p. 30.*

Tóth S., Oreifig A., Toldi O., Kiss E. és Jenes B. (1999) Herbicidrezisztens rizs előállítása *in vitro* szelekcióval. (Production of herbicide resistant rice through *in vitro* selection.) *IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Április 11-14, Siófok. Program Összefoglalók p. 169.*

Toldi O., **Tóth S.,** Oreifig A.S., Kiss E. and Jenes B. (1999) Production of herbicide resistant rice by *in vitro* selection. *Use of Agriculturally Important Genes in Agricultural Biotechnology*, *NATO Advanced Research Workshop, 17-21. Oct., Szeged, Hungary. In: Abstracts and Participants, p. 12.*

Toldi O., Szittya Gy., **Tóth S.** és Burgyán J. (2000) A hazai termesztésben súlyos károkat okozó vírusokkal (MDMV, SCMV) szemben rezisztens kukorica vonalak előállítása genetikai transzformációval. *73. Országos Mezőgazdasági, Élelmiszeripari Kiállítás és Vásár, 'Fiatal Agrárkutatók Fóruma' Budapest, szeptember 3-7., In: Programfüzet 10. old.*

Spitkó T., **Tóth S.,** Toldi O., Kiss E. és Heszky L. (2001) Kukorica genotípusok hajtásregenerációjának összehasonlítása *in vitro* rendszerben. *VII. Növénynemesítési Tudományos Napok, január 23-24., Budapest, in: Összefoglalók 130. old*