

Zárójelentés

a "Molekuláris genetikai és szövettenyésztési módszerekkel előállított növények herbicid- és nehézfém-tűrőképességének, illetve biotikus stresszekkel szembeni ellenállóképességének vizsgálata" című OTKA pályázat (T43476) eredményeiről (2003-2006)

1. Bevezetés és célkitűzés

Évtizedekkel a modern mezőgazdasági és ipari technológiák széleskörű elterjedése után a Föld jelentős területein halmozódott fel nehézfém és szerves szennyeződés. Az erősen szennyezett talajokon nem jöhet létre a talajtípusnak és éghajlatnak megfelelő mezőgazdasági termelés, ezért a talaj további gyors ütemű pusztulása folytatódik. Napjaink kiemelt környezetvédelmi feladata e területek megtisztítása, remediálása. Számos növényfaj képes a talaj szennyezőanyagait felvenni és/vagy lebontani és eközben tolerálni a szennyeződések által okozott stresszt. Ezen a jelenségen alapszik a fitoremediáció technológiája. A fitoremediáció azon remediációs eljárások összefoglaló neve, amelyek növények felhasználásával tisztítják meg a talajt a bennük lévő szennyeződésektől. A fitoextrakció során a növények tápanyagfelvevő mechanizmusát használjuk fel a szennyezőanyagok talajszint feletti szövetekben történő akkumulációjának megvalósításához. Néhány egymást követő növekedési periódus után a föld fölötti biomasszát begyűjtve a szennyezés eltávolítható a területről. A növényanyagból készült hamuban tovább koncentrálhatjuk a szennyezőanyagokat, amelyeket így újrahasznosíthatunk, vagy speciális hulladéktárolókban helyezhetünk el. Az eljárás jelentőségét az adja, hogy a több száz négyzetkilométer nagyságú területek megtisztításánál a fitoremediáció lehet az egyetlen hatékony módszer, mert a rendelkezésre álló fizikai és kémiai módszerek drágák és általában durva beavatkozást jelentenek a környezetre. Fitoremediációra azok a növények lehetnek alkalmasak, amelyek stressztűrőképessége kiemelkedő, mert a növény számára a szennyezett talaj stressztényezőként jelentkezik. A szennyeződések tűrő növények alkalmazásának további új területe az eddig a mezőgazdaság és erdészet számára marginális területeken történő talajvédő növénytársulások létrehozása.

A nyárfa (*Populus*) fajok kiválóan alkalmazhatóak fitoremediációra. Gyökérzetük a talaj mélyebb rétegeit is eléri, nagy a növekedési erélyük, nagy mennyiségű biomasszát termelnek, könnyen szaporíthatóak, a világon széles körben elterjedtek. A nyárfa a biotechnológiai módszereknek is modellnövénye, könnyen mikroszaporítható, transzformációs rendszere kidolgozott, genetikai térképek rendelkezésre állnak és napjainkban a teljes genom bázissorrendjét is meghatározták. Eddigi ismereteink a növények abiotikus stresszre és a környezet változásaira adott válaszáiról szinte kizárólag egyéves lágyszárú növényeken végzett kutatásokból származnak. A nyárfanemesítésben a genetikai markerek alkalmazása kiemelt jelentőséggel bír. Tekintettel arra, hogy a mikroszatellita-szakaszok (SSR: simple sequence repeat) a DNS-állomány legváltozatosabb részét képezik, a módszer genotípusok elkülönítése mellett rokonsági/leszármazási kapcsolatok feltárására is jól alkalmazható.

Genetikai módosítással a növények stressztoleranciája és ezáltal remediációs képessége növelhető. Az 1997-1998 évek során nemzetközi együttműködés keretében transzgenikus szürkenyár (*Populus* × *canescens*) klónokat hoztak létre, amelyekben a növényi antioxidáns glutation túltermeltetését érték el. A transzformáns növényektől azt remélték, hogy a vad típusú szürkenyárhoz képest nagyobb stressztűrőképességgel fog rendelkezni, amit számos

stressztényező esetében igazoltak is. A nagyobb stressztűrőképességgel rendelkező nyárfák fitoremediációra is alkalmasabbak lehetnek a vad típusú növényekhez képest, mert a stressztűrés a fitoremediáció egyik kulcstulajdonsága. E képesség átfogó jellemzése valamint a stresszfolyamatok háttérében álló molekuláris és élettani folyamatok jobb megismerése volt a pályázat egyik fő célkitűzése.

Glutation-függő méregtelenítő reakciók növényi sejtekben

A növényi sejtekben található redukált tripeptid glutation (GSH, γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin) a legfontosabb és a legnagyobb mennyiségben előforduló tioltartalmú természetes vegyület növényi szövetekben. Kimutatták, hogy a növények kémiai és biológiai stressztűrőképessége valamint a glutation metabolizmusa, felhalmozódása és az ezt szabályozó enzimek aktivitása között összefüggés mutatható ki. A glutation bioszintézise két ATP-t igénylő lépésben megy végbe. Az első lépésben a γ -glutamilcisztein (γ -EC) jön létre a glutaminsav és a cisztein között kialakuló peptidkötéssel amelyben a glutaminsav gamma helyzetű karboxilcsoportjával vesz részt. A második lépésben glicin kapcsolódik a C-terminális helyzetű ciszteinhez, így létrejön a glutation tripeptid. Az első lépést a γ -glutamilcisztein-szintetáz (γ -ECS) enzim, a másodikat a glutation-szintetáz (GS) enzim katalizálja. A γ -ECS enzimet a *gsh1* (vagy *gshA*) gén kódolja a GS enzimet pedig a *gsh2* (vagy *gshB*).

A GSH többféle módon is részt vehet a stressz elleni védekezésben: A szulfhidril csoportjának köszönhetően jelentős antioxidáns kapacitással rendelkezik. Közvetlenül reakcióba léphet reaktív oxigén formákkal (ROS). A reakció során oxidált glutation (GSSG) keletkezik. A GSSG visszaalakulását GSH-vá a glutation reduktáz enzim (GR) katalizálja. A reakcióhoz a fotoszintetikus elektrontranszport-láncban képződött NADPH-t használja föl. A GSH képes a fehérjék diszulfid kötését redukálni és így semlegesíteni a ROS károsító hatásait, mert a protein diszulfidok képződése az oxidatív stressz egyik folyamánya. Azonkívül a tiol-diszulfid kötések cseréjének általános jelentősége van az enzim aktivációban, proteinek védelmében és a sejtek regulációs folyamataiban. A GSH-nak jelentős szerepe van a nehézfém-stressz elleni védekezésben. Többféle fém indukálja a γ -Glu-Cys peptidek (fitokelatinok) megjelenését a növényekben. A GSH és más kéntartalmú peptidek a xenobiotikumok nagy csoportjával is képesek reakcióba lépni, ezért e molekuláknak kiemelkedő szerepe van a toxikus kémiai anyagok elleni védelemben. A detoxifikáció GSH-val történő konjugáció során történik meg, amelyet a glutation S-transzferáz (GST) izoenzimek végeznek. A GST enzimek a növényekben nagy mennyiségben vannak jelen, a kukorica leveleiben a vízdoldható fehérjék több mint 1%-át alkotják. Sok esetben a GST enzimek a felelősek a termesztett növényeink herbicid toleranciájáért illetve a gyomnövények rezisztenciájáért.

Magas glutation tartalmú transzgenikus növények

Az antioxidánsok génjeivel történő transzformáció célja az oxidatív stressztűrőképesség javítása. Az ilyen típusú transzformációknak a fás növényeknél különösen nagy a jelentősége mert élő növények, ezért hosszú ideig ki vannak téve a környezeti stressztényezőknek. Az ilyen jellegű, glutation anyagcserében történő genetikai módosításokhoz az INRA 717-1-B4 jelű *Populus × canescens* klónokat használták fel, mert ez a klón fogékonyan bizonyult az *Agrobacterium tumefaciens*-el történő fertőzésre. A transzformációk célja minden esetben a GSH tartalom növelése volt. Öt transzformáns nyárfában sikerült a γ -glutamilcisztein-szintetáz enzimet (γ -ECS) túltermeltetni (ggs típusok), amelyekben egy bakteriális eredetű γ -

ECS a citoszolban termelődik. A transzformáns vonalak leveleiben 2-4 × nagyobb GSH tartalom volt mérhető a kontroll vonalakhoz képest. Későbbi munkákban a bakteriális γ -ECS enzimet a kloroplasztiszban termeltették túl (Lgl vagy Lggs). Hét független vonalat állítottak elő amelyekből öt különösen nagy γ -ECS aktivitást mutatott. Hasonlóan a ggs klónokhoz az Lgl konstrukciókban is erősen nőtt a tiol tartalom. Ezek a transzgenikus növények bizonyítják, hogy a γ -ECS túltermelésével a növényekben megemelhető a GSH tartalom a növény növekedésének károsodása nélkül.

Nyárfa alkalmazása a fitoremediációban

A fitoremediáció egyik kritikus pontja a megfelelő növényfaj kiválasztása, amelyik képes tolerálni nagy mennyiségű szennyezőanyagot a talajban. A fitoremediáció hatékonyságát lényegesen befolyásolja, hogy a növény mennyire képes a tolerálni a szennyező anyagok toxikus formáinak nagy koncentrációját. A *Populus* fajok alkalmassága a fitoremediációra nem vitatható. Ültetésük egyszerű, növekedésük gyors (4-5 m/év). Magas a transpirációs rátájuk, terebélyes gyökérzetük miatt elérik a talaj mélyebb rétegeit, könnyen adszorbeálják, lebontják és/vagy detoxifikálják a szennyezőanyagokat, miközben gátolják a talajeróziót. Fajai világszerte elterjedtek főként az ártéri területeken, így nagy valószínűséggel található a potenciális fitoremediációs területekre megfelelő *Populus* faj. A nyárfa vegetatív úton könnyen szaporítható. A nyár nem része az emberi táplálékláncnak, habár számos állatfaj hasznosítja a nyárfákat táplálékként, lakhelyként illetve párási területként. A *Populus* fajok a fás növények közül a legjobban tanulmányozott genotípusok, számos módszert dolgoztak ki erdészet, vegetatív szaporítási, nemesítési és betakarítási eljárásokra. Azon kívül szövettenyésztési technikák, genetikai módosítás és genetikai térképezés is könnyen elvégezhető. Ezek alapján *Populus* ideális jelölt a genetikai transzformációra, valamint a fitoremediációra történő nemesítésre.

Sejtklónok variabilitása nyárfában

A fás növények *in vitro* klonális szaporítása hatékony módszer az elit genotípusok fölszaporítására a létrehozható utódok nagy száma miatt. Azoknál a fajoknál ahol a vegetatív szaporítás nehézségekbe ütközik, a mikroszaporítás lehet a módszer a genotípusok változatlan fenntartására. A szövettenyésztés során a sejt szabályozási folyamatai károsodást szenvedhetnek, ami a genetikai anyag megváltozását is előidézhetheti a szövettenyésztés során létrejött utódnemzedékben, vagyis szomaklonális variabilitás jöhet létre. E variabilitás előfordulása potenciális nehézséget jelenthet egy elit növényanyag mikroszaporítással való fenntartása és fölszaporítása során. Azonban a stabil szomaklonális változatok felhasználhatóak a nemesítésben. A szomaklonális variabilitás eredményezhet különböző morfológiai, fiziológiai változásokat illetve a növény betegség-ellenállósága is megváltozhat. A szomaklonális variabilitásnak az évelő és fás növényeknél különösen nagy a jelentősége, mert előfordulhat, hogy egy olyan tulajdonság változik meg amely fenotípusosan csak késői fejlődési stádiumban vagy csak az utódokban jelenik meg. A *Populus* nemzetségben beszámoltak már számos tulajdonság megváltozásáról (morfológiai, fiziológiai, biokémiai, betegségrezisztencia, herbicid tolerancia) amely szövettenyésztés során regenerált utódokban jelentkezett. Számos módszerrel lehet detektálni a szövettenyésztés során létrejött mutációkat melybe beletartozik a fenotípus azonosítás, citológiai módszerek, biokémiai és molekuláris markerek.

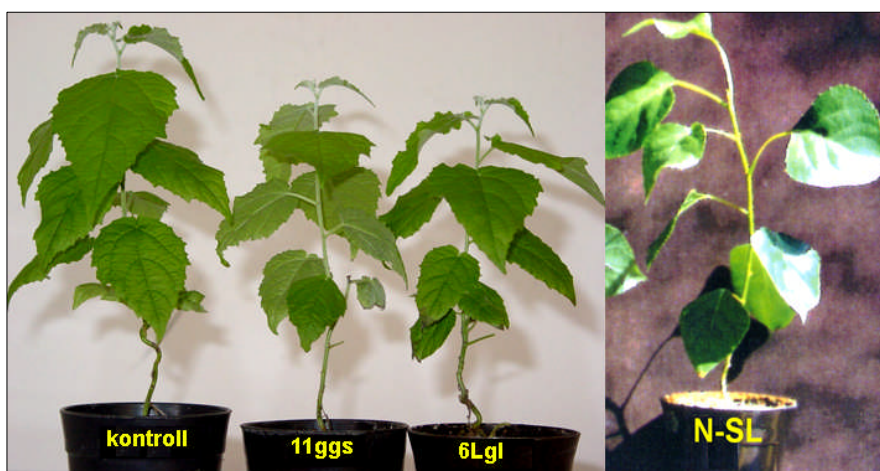
2. Anyag és módszer

Növényanyag

A vizsgálatokhoz a szürkenyárhíbrid (*Populus tremula* × *Populus alba* = *Populus* × *canescens*) géntechnológiával módosított klónjait alkalmaztuk (INRA No.717-1-B4):

- 11ggs
- 6Lgl
- nem-transzformált szürkenyár kontroll
- fekete nyár N-SL klón

A szürkenyár klónok (11ggs, 6Lgl, kontroll) steril hajtásai Németországból (Albert-Ludwigs-Universität, Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie, Freiburg) érkeztek (1. ábra). A negyedikként vizsgált fekete nyár N-SL klónját (*Populus nigra*, Sárvári Lovasiskola) az Erdészeti Kutató Intézet Sárvári Kutatóállomása nemesítette ki. In vitro tenyésztetbe vonását rügykultúrából indított hajtástenyésztetben végeztük el.



1. ábra A *Populus* × *canescens* transzgénikus (11ggs, 6Lgl) és kontroll klónjai valamint a *Populus nigra* N-SL klónja

A növényeket az *Escherichia coli* baktériumból származó γ -glutamil-cisztein szintáz (γ -ECS) enzimet kódoló génnel (*gsh1*) transzformálták. A *gsh1* gén cDNSe klóntárból állt rendelkezésre. A gén eredeti start-kodonját (TTG) PCR technikával ATG szekvenciára módosították. Magát a kódoló szekvenciát (1,7 kb) tartalmazó *HindIII/SmaI* fragmentumot a pLBR19 plazmidba klónozták. A promóter a karfiol mozaik vírus (CaMV) konstitutív 35S promótere volt, dupla felerősítő (enhancer) szekvenciával (p70) és a CaMV poli-A szekvenciájával. Ezt a CaMV-35S promóter – *gsh1* – poli-A gén-kazettát a pBIN19 (BEVAN 1984) bináris vektorba klónozták egy *SstI* / *XbaI* inszertben. Az így megkonstruált vektort építették be az *Agrobacterium tumefaciens* C58 pMP90 törzsébe, és ezzel végezték el a szürkenyár híbrid (*P.* × *canescens*) genetikai transzformációját.

In vitro szaporítás és fenntartás

A meggyökeresedett hajtások szárait feldarabolva, az 1-2 nóduszos fragmentumokat hormonnal kiegészített hajtásregeneráló WPM táptalajra helyezve újabb hajtások regenerálódtak. A megfelelő méretet elért hajtásokat hormonmentes táptalajba helyezve gyökeres hajtások fejlődtek. A tenyészeteket 22 ± 2 °C-on neveltük fényszobában (40 W-os Tungstram fénycsövek) fluoreszcens fényben, 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódusnál és $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett. Az állományt így évek óta sikerül fenntartani és szaporítani in vitro körülmények között. Mikroszatellita elemzéshez portok eredetű, szabadföldön nevelt feketenyár (*P. nigra*) szomaklónokat is bevontunk a kísérletbe. Az általunk vizsgált összesen 36 szomatikus klón közül 29 (1.-29.) az N-SL (30.) klónról származik, 6 klón (31.-36.) pedig az N-309 (37.) klónról. A klónok fejlesztése a következő módon történt: duzzadt rügyekből 4 °C-os hidegkezelést és felületi sterilizést követően portokot izoláltak és hormonokkal és szacharózzal kiegészített MS táptalajon kalluszt indukáltak belőlük 6-7 héten keresztül 25 °C-on sötétben. A kifejlett kalluszokat hajtásregeneráló MS vagy WPM táptalajra helyezték és 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódusban inkubálták. A regenerálódott hajtásokat gyökerindukáló táptalajra helyezték. A gyökeres növényeket cserépbe ültették majd a megfelelő méret elérése után szabadföldi kiültetésre került sor.

Táptalajok. A nyárnövények in vitro fenntartásához, mikroszaporításához, valamint a stresszkísérletekhez WPM (Woody Plant Media) táptalajt használtunk.

Molekuláris biológiai módszerek.

Genomikus DNS izolálást 0,1 g friss levélszövetből CTAB (cetil-trimetilammonium-bromide) extrakciós pufferrel végeztük. Totál RNS izoláláshoz TRI reagenst (Sigma) használtunk. Az izolálást megelőzően RNáz mentes vizet készítettünk: vízben 0,01 % dietil-pirokarbonátot (DEPC) oldottunk egy éjszakán át, majd autoklávoztuk.

Transzgén stabilitásának kimutatása

A transzformált szürkenyár klónokba bevitt *E. coli gsh1* transzgén (Genbank No. X03954) valamint a konstrukcióban szereplő karfiolmozaik vírus 35S promótere, és a 6Lgl klónba beépített borsó (*Pisum sativum*) RUBISCO kis alegységének tranzitpeptidje (*pea rbcS*, Genbank No. M25614) jelenlétének bizonyítására PCR reakciókat végeztünk. A PCR reakcióhoz totál DNS-t izoláltunk következő primerek alkalmazásával:

- 35S a: 5'-gct cct aca aat gcc atc a-3' (a CaMV 35S promóter 154-172 bp pozíciójában)
- gsh1 a: 5'-atc ccg gac gta tca cag g-3' (a *gsh1* gén 341-359 bp pozíciójában)
- gsh1 b: 5'-gat gca cca aac aga taa gg-3' (a *gsh1* gén 939-920 bp pozíciójában)
- *pea rbcS* a: 5'-cag aag tga gaa aaa tgg ct-3' (*pea rbcS* gén 18-37 bp pozíciójában)
- *pea rbcS* b: 5'-cat gca ctt tac tct tcc ac-3' (*pea rbcS* gén 186-205 bp pozíciójában)

A primereket a szekvenciaadatokból Primer3 programmal (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) terveztük.

A reakciókat Perkin Elmer 9700 Thermocycler készülékben végeztük. A reakcióelegy összetétele 25 μl végtérfogatban: 1 \times puffer (West Team); 1 μM MgCl_2 ; 1,2 mM dNTP; 1 U Taq polimeráz (West Team), 1-1 μM forward-reverse primer, 50-100 ng templát DNS. A kapott DNS fragmenteket az agaróz gélből spin column készlettel (Sigma) visszaizoláltuk, majd a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ szekvenáló laboratóriumába küldtük szekvenálásra. A visszakapott szekvencia adatokat BioEdit Sequence Alignment Editor

szoftverrel dolgoztuk föl. Hasonlósági adatokat BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programmal kerestünk az NCBI (National Center for Biotechnology Information) honlapján.

Transzgén expressziójának kimutatása

A szürkenyár klónokba bevitt transzgén expressziójának bizonyítására RT-PCR reakciót végeztünk. A klónokból (11ggs, 6Lgl, kontroll) totál RNS-t izoláltunk, abból cDNS-t készítettünk. A cDNS-t templátként használva PCR reakciókat indítottunk a gsh1 a és gsh1 b primerpárral. A reakcióelegy összetétele 16 µl végtérfogatban a következő volt: 1 × AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems); 0,625 – 0,625 µM forward-reverse primer; 3 µl cDNS. A reakciótermékek szeparálását horizontális agaróz gélen (1,5 %) végeztük és etidium-bromidos festéssel tettük láthatóvá.

Klónstabilitás tesztelése fAFLP módszerrel. A szürkenyár klónokból (11ggs, 6Lgl, kontroll) totál DNS-t izoláltunk, klónonként 10-10 ismétlésben. A DNS mintákból klónonként *bulk*-okat hoztunk létre.

A klónok stabilitását fAFLP (fluorescent amplified DNA fragment length polymorphism) eljárással vizsgáltuk a DNS mintákból létrehozott *bulk*-okon. Az emésztéshez és ligáláshoz az *EcoRI-MseI* restrikciós endonukleázokat használtuk (1. táblázat).

A terméket 0,1× TE-vel 5× hígításban templátként használtuk a szelektív PCR reakcióhoz. A szelektív amplifikációhoz 24 primer-kombinációt használtunk JOE fluoreszcens festékkel jelölt **Eco* primerekkel. Az első tizenkét primer kombinációban az *Mse*-CAC primert párosítottuk a jelölt **Eco* -aaa, -aac, -aag, -aat, -aca, -acc, -agg, -act, -aga, -agc, -agg, -agt primerekkel. A második tizenkettő kombinációban a jelölt **Eco*-AGT primert párosítottuk az *Mse* -caa, -cag, -cat, -cca, -ccc, -ccg, -cct, -cga, -cgc, -cgg, -cgt, -cta primerekkel. *Hot Start* PCR-rel kombinált *touchdown* PCR reakciót alkalmaztunk a minták felszaporítására. A reakcióelegy végtérfogata 10 µl amely tartalmazott 1 × AmpliTaq Gold PCR Master Mix-et, 20 pmol mindkét primerből, valamint 50 ng DNS templátot. Az első PCR reakciót a nem szelektív primerekkel (3/4. táblázat) 30 ciklusban végeztük a következő ciklusidőkkel: 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 perc. A *touchdown* PCR-t PE 9700 Thermocycler készülékben (Applied Biosystem) következők szerint végeztük: 12 cikluson keresztül a 30 s hosszú kapcsolódási hőmérsékletet (T_m) egyenletesen 66 °C- ról 56°C-ra csökkentettük. További 25 ciklust 56 °C kapcsolódási hőmérséklettel végeztünk majd az utolsó ciklus: 60 °C -on 45 s-ig tartott.

Az AFLP amplifikátumokat 5 percig 98 °C-on denaturáltuk és 30 percig 60 °C-on tartottuk vagy közvetlenül ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) készülékkel fragment analízist végeztünk. Az eredményeket ABI PRISM Genotyper 3.7 NT szoftverrel dolgoztuk föl.

1. táblázat Az fAFLP-nél alkalmazott restriktív enzimek (ritkán hasító *EcoRI* és gyakran hasító *MseI*), adapterek, a nem szelektív és a 12 aktív szelektív primer pár (a-l) szekvenciaadatai

<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
Restriktív helyek	
▼ 5'-..... gaattc-3' 3'-..... cttaag-5' ▲	▼ 5'-..... ttaa-3' 3'-..... aatt-5' ▲
Adapter szekvenciák	
5'-ctc gta gac tgc gta cc cat ctg acg cat ggt taa-5'	5'-gacg atg agt cct gag tac tca gga ctc AT-5'
Nem szelektív primerek	
<i>EcoA</i> :	<i>MseC</i> :
5'-gac tgc gta cca attc- a	5'-gat gag tcc tga gtaa- c
Szelektív primerek	
(a) 5'-gac tgc gta cca attc- aat	
(b) 5'-gac tgc gta cca attc- acc	5'-gat gag tcc tga gtaa- cac
(c) 5'-gac tgc gta cca attc- agt	
(d)	5'-gat gag tcc tga gtaa- caa
(e)	5'-gat gag tcc tga gtaa- cag
(f)	5'-gat gag tcc tga gtaa- cat
(g)	5'-gat gag tcc tga gtaa- ccc
(h) 5'-gac tgc gta cca attc- agt	5'-gat gag tcc tga gtaa- cct
(i)	5'-gat gag tcc tga gtaa- cga
(j)	5'-gat gag tcc tga gtaa- cgg
(k)	5'-gat gag tcc tga gtaa- cta
(l)	5'-gat gag tcc tga gtaa- ctc

Cink stressz in vitro

A Zn terhelési kísérleteket aszeptikus körülmények között levélkorong-tenyészetekkel végeztük ZnSO₄ oldat felhasználásával. Hormonnal kiegészített hajtásregeneráló WPM táptalajhoz ZnSO₄ oldatot különböző koncentrációkban adagoltuk. A táptalajok végkoncentrációit a következő értékre állítottuk be: 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹ M és cinkmentes kontroll. Steril nyárfa hajtások fiatal leveleiből 8 mm átmérőjű levélkorongokat vágunk melyeket színükkel felfelé a táptalajra helyeztünk. A tenyészeteket 21 napig inkubáltuk 19 °C-on 8 h sötét / 16 h fény (40 μmol m⁻² s⁻¹) fotoperiódusban.

Paraquat stressz in vitro

Hormonokkal kiegészített (1 mg/l BA; 0,2 mg/l NAA) WPM táptalajhoz eltérő mennyiségű paraquatot (metil-viologén, Sigma) adagoltunk. A paraquat végkoncentrációit a táptalajokban a következő értékekre állítottuk be: 4×10⁻³ M; 4×10⁻⁴ M; 4×10⁻⁵ M; 4×10⁻⁶ M; 4×10⁻⁷ M; 4×10⁻⁸ M; 4×10⁻⁹ M; 4×10⁻¹⁰ M illetve paraquat nélküli kontroll. A sterilre szűrt paraquat oldatot az autoklávozott táptalajhoz szilárdulás előtt adagoltuk. A táptalajok szacharóz tartalma 0,2 %, 1 %, ill. 2 % volt. Az elkészített, agarral szilárdított táptalajokat petricsészékbe öntöttük. Steril, két hónapos nyárfa hajtások fiatal leveleiből vágott levélkorongokat helyeztünk rájuk színükkel felfelé. A tenyészeteket 20 °C-on, 24 h sötét ill. 16 h fény (40 μmol m⁻² s⁻¹) / 8 h sötét fotoperiódusú fényszobában 8 napon keresztül inkubáltuk.

Biokémiai vizsgálatok

Levéلكorongok nehézfém-tartalmát ICP (inductively coupled plasma spectrophotometer) készülékkel mértük meg az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézetében. A glutation S-transzferáz enzim aktivitását spektrofotometriás módszerrel mértük meg CDNB-t alkalmazva szubsztrátként. Az antioxidáns aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitását szintén spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Három független mérésből kapott értékeket t-próbával hasonlítottuk össze a kontroll értékeivel. Az 5 % fölötti eltéréseket szignifikánsnak fogadtuk el.

Klorofill fluoreszcencia

A fotoszintetikus aktivitást és a stressz-kondíciót CFM-636973 típusú klorofill fluorométerrel jellemeztük. A készülékkel az $F_v/F_m [(F_m - F_o)/F_m]$ arányszámot 690 nm-en és az F_{690}/F_{735} hányadost F_{max} -nál mértük. A mérést megelőzően a levéلكorongokat 20 percig sötétben tároltuk. A mérések időtartama 4 perc volt. A méréseket három ismétlésben végeztük. Az eredményeket varianciaanalízissel hasonlítottuk össze 5 %-os szignifikanciaszintnél, valamint post-hoc tesztet végeztünk LSD (least significant difference) módszerrel.

RT-PCR analízis

Szubletális mennyiségű paraquatot tartalmazó (4×10^{-7} M) hajtásregeneráló WPM táptalajon tenyésztett nyár levéلكorongokból totál RNS-t izoláltunk és cDNS-t szintetizáltunk. A génexpressziós vizsgálatokhoz génspecifikus primereket alkalmaztunk. Degenerált primereket terveztünk Primer3 program segítségével a kukorica *gst27* (X79515) szekvenciához BLAST program alapján leginkább hasonló 10 nyárfa EST szekvenciákra (Populus DB).

5'- gca caa gaa aga gcc (a/g)tt cc -3' - 5'- agc tcc cag ttc agc ttt ga -3'

A kloroplasztban kódolt *rbcS* génre tervezett primereket alkalmaztunk a sejtek klorofilltartalmának kimutatására:

5'-agc ttg taa gag atg gct tcc tc -3' - 5'-cca cat agt cca gta gcg tcc at -3'

Kontrollként a 26S *rRNS* gént használtuk:

5'-ttc cat ggt tgc atc ctt cc-3' - 5'-gca ggg cga tgc ttt tc -3'

Az RT-PCR reakcióelegy összetétele 16 μ l végtérfogatban a következő volt: 1 \times AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems); 0,625 – 0,625 μ M forward-reverse primer; 3 μ l cDNS. A ciklusidőket és hőmérsékleteket a 2. táblázat tartalmazza. A reakciókat Perkin Elmer 9700 Thermocycler készülékkel végeztük a PCR termékeket agaróz gélen futtattuk a sávok erősségét denzitometráltuk (ChemilmagerTM 4400, Alpha Innotech Corporation, USA) és számítógéppel elemeztük (Phoretix 1D Advanced, Nonlinear Dynamics, Ltd). A sávok intenzitásértékeiből számoltuk a kontrollként használt 26S *rRNS* génhez képest a relatív génexpressziót.

Mikroszatellita diverzitás feketenyár sejtklónokban

Vizsgálatainkat öt mikroszatellita primer párral végeztük. A primerek szekvenciáit a 3. táblázat tartalmazza. A reakcióelegy összetétele 25 μ l végtérfogatban: 1 \times puffer (West Team); 1 μ M MgCl₂; 1,2 mM dNTP; 1 U Taq polimeráz (West Team), 1-1 μ M forward-reverse primer, 50-100 ng templát DNS. A mikroszatellita fragmentek felszaporítása *touchdown* PCR-rel történt. A ciklusidőket és hőmérsékleteket a 4. táblázat tartalmazza.

2. táblázat Az RT-PCR reakciók hőmérsékletei és ciklusideje

Ciklus	Hőmérséklet	Idő
1 ×	95 °C	120 s
32 ×	95 °C	10 s
	60 °C	30 s
	72 °C	60 s
1 ×	72 °C	600 s
	4 °C	∞

3. táblázat A *P. nigra* mikroszatellita régióinak felszaporításához alkalmazott primerek szekvenciái, az ismétlődő szekvenciamotívumokkal, irodalmi hivatkozással és NCBI hivatkozási számokkal

SSR lókuszt (Accession No)	primer pár (5' - 3' irányban)	ismétlődő szekvencia	forrás
1 WPMS-02 (AJ297270)	aga aat acc cct gct aat c aat gtt ttt gtt ccg tga at	(GA) ₂₃	(VAN DER SCHOOT et al. 2000)
2 WPMS-04 (AJ297273)	tac acg ggt ctt tta ttc tct tgc cga cat cct gcg ttc c	(GT) ₂₅	(VAN DER SCHOOT et al. 2000)
3 WPMS-06 (AJ297275)	gta taa cga tga ccc cac gaa gac tat aaa taa agg cat gac cag aca	(GT) ₂₄	(VAN DER SCHOOT et al. 2000)
4 WPMS-20 (AJ297293)	gtg cgc aca tct atg act atc g atc ttg taa ttc tcc ggg cat ct	(TTCTGG) ₈	(SMULDERS et al. 2001)
5 PTR-4	aat gtc gag gcc ttt cta aat gtc t gct tga gca aca aac aca cca gat g	(TC) ₁₇	(DAYANANDAN et al. 1998)

4. táblázat A mikroszatellita elemzéshez használt PCR reakció hőmérsékletei és ciklusideje

Ciklus	Hőmérséklet	Idő
1 ×	95 °C	3 min
11 ×	95 °C	30 s
	65 °C → 55 °C (ciklusonként -1 °C)	30 s
	72 °C	60 s
	95 °C	30 s
25 ×	56 °C	30 s
	72 °C	60 s
	72 °C	5 min
1 ×	4 °C	∞

Az SSR primer párok egyik tagját a fluoreszcens Cy5 molekulával jelöltük. A Cy5 abszorbanciája 643 nm-en emissziója 667 nm-en veszi föl a maximális értéket. Az SSR fragmentek szeparálását ALF express II DNA Analyser (automated laser fluorometer) készülékkel ReproGel High Resolution PAGE gél (24 %) (Amersham Bioscience) használatával rövid thermoplate-en végeztük. A futtatást 850 V-on, 50 mA-el, 50 W teljesítménnyel, 50 °C-on 120 percen keresztül végeztük.

Az adatok feldolgozása ALFwin Fragment Analyser 1.03 szoftverrel történt. A futtatásokhoz Cy5-el jelölt külső és belső molekulatömeg markereket alkalmaztunk standardként. A fragmentek léte és nem léte alapján SPSS 11 programmal klaszter analízis során dendrogrammot készítettünk Jaccard index használatával, csoporton belüli átlagos kapcsoltóságok (Average Linkage, within group) figyelembevételével. Az egyes lókuszok variabilitását a PIC (Polymorphism Index Content) értékkel jellemeztük. A WPMS 20 primerrel kapott DNS fragmenteket agaróz gélből spin column készlettel (Sigma) visszaizoláltuk, majd a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ szekvenáló laboratóriumába küldtük őket.

3. Eredmények és megvitatás

A gsh1 transzgén jelenlétének és expressziójának bizonyítása

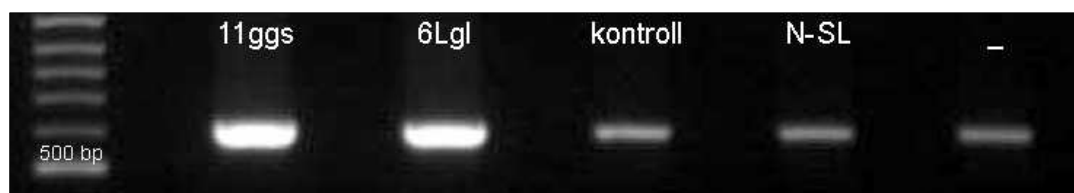
A rekombináció alapvető feltétele a kétszálas DNS törése nem csak a meiotikus hanem a szomatikus sejtekben is előfordulhat. Az évek során mikroszaporítással fenntartott transzgénikus nyártenyészetekben ez a transzgén törését is jelentheti, ezért szükséges a transzgén jelenlétének és expressziójának rendszeres ellenőrzése.

A 35S a és gsh1 b primerekkel sikerült fölszaporítani a várt fragmenteket (869 bp és 1208 bp) és ezzel a kombinációval el is különíthető egymástól a két transzgénikus klón. A 6Lgl klónban sikeresen kimutattuk a borsó *rbcS* gén tranzitpeptidjének jelenlétét a *pea rbcS a/pea rbcS b* primerpárral (2. ábra).



2. ábra A) A transzgénikus nyárakba bevitt bináris vektor részleteinek kimutatása 35S a / gsh1 b primerpárral. szürkenyár (*Populus × canescens*) transzgénikus 11ggs és 6Lgl, valamint a nem transzformált kontroll klónjaiban, DNS nélküli kontrollal (-). **B)** A transzgénikus 6Lgl klónba beépített borsó *rbcS* gén jelenlétének bizonyítása *pea rbcS a / pea rbcS b* primerpárral.

A gsh1 a és gsh1 b primerekkel végzett PCR reakció során a transzgénikus klónokban sikerült fölszaporítani a várt 601 bp méretű DNS fragmentet de azonos méretű terméket kaptunk a kontroll és N-SL mintákban, illetve a negatív kontrollban is (-) (3. ábra). A nem várt fragmenteket a Taq polimeráz enzimben lévő *E. coli*-ből származó DNS szennyeződés okozhatta. Az expresszió bizonyításához a gsh1 a/gsh1 b primerpárt alkalmaztuk amivel megkaptuk a várt fragmentumokat, de halvány fragmentumokat kaptunk a kontroll nyárfaklónban illetve a negatív kontrollban is, aminek szintén az enzimben lévő *E. coli* DNS szennyeződés lehet az okozója.



3. ábra A transzgén jelenlétének kimutatása az *E. coli*-ből származó *gsh1* transzgén egy szakaszának PCR-rel történő felszaporításával a transzgénikus szürkenyár (*Populus × canescens*) 11ggs és 6Lgl klónjaiban, valamint a nem transzformált szürkenyár (kontroll) és feketenyár (*P. nigra*) N-SL klónokban, DNS nélküli kontrollal (-).

A kapott 601 bp hosszúságú fragmenteket megszekvenáltattuk. A *gsh1 a* / *gsh1 b* primerpárral valamint a *pea rbcS a* / *pea rbcS b* primerpárral kapott fragmenteket megszekvenáltattuk. A BLASTn programmal kapott eredményeket a 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A transzgénikus klónokból felszaporított és megszekvenált DNS fragmentek BLAST programmal kapott értékei

klón	fragment	Accession N ^o	E érték (Expect)	Azonosság
11ggs	<i>gsh 1</i>	X03954	1e-26	80/87 (91%)
6Lgl	<i>gsh 1</i>	X03954	6e-22	88/100 (88%)
6Lgl	<i>pea rbcS</i>	M25614	5e-41	112/119 (94%)

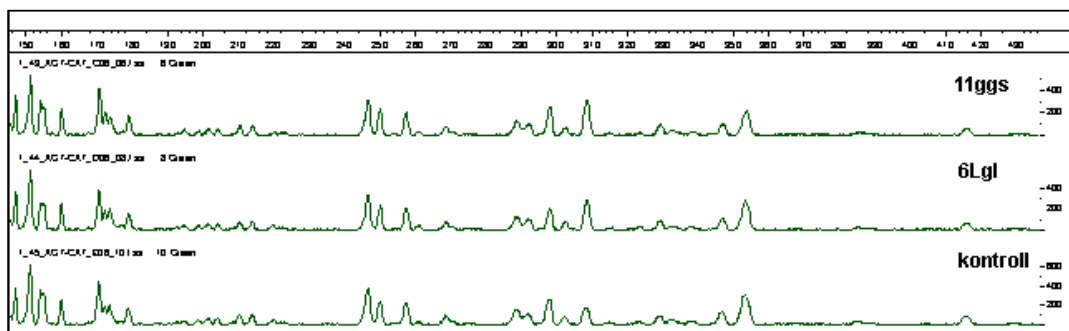
A szekvencia azonossági értékére 90 % körüli értékeket kaptunk. A BLAST analízis eredménye alapján kijelenthetjük, hogy a nyárklónokba beépített konstrukció stabilan jelen van.

A gsh1-transzgénikus Populus × canescens klónok genetikai stabilitása

A mikroszaporítással fenntartott klónok genetikai azonosságát AFLP módszerrel vizsgáltuk. A 24 szelektív primerkombinációból 12 adott éles és reprodukálható AFLP mintázatot (4. ábra). Összesen 682 közös AFLP fragmentet detektáltunk (6. táblázat). A szelektív primer párok átlagosan 56,6 fragmentet szaporítottak föl, amely hasonló a feketenyárnál (*P. nigra*) megfigyelt fragmentum számhoz ahol két primer pár összesen 104 fragmentumot szaporított föl (SMULDERS et al. 2001). A leghatékonyabb primer kombinációnak az *Eco*-AGT / *Mse*-CAT bizonyult, klónonként 35 fragmentumot szaporított föl. Valószínűleg összefüggés lehet a genom mérete és az AFLP fragmentumok száma között. Egy korábbi, búzán (*Triticum aestivum* L.) végzett kísérletnél az *Eco*-AGT / *Mse*-CAC primer pár amplifikálta legtöbb fragmentet összesen 47-et. A búza genom mérete igen nagy ($2n = 6 \times = 42; 16 \times 10^9$ bp ami 16,58 pg-nak felel meg a 965 Mbp = 1 pg DNS egyenlőség alapján számolva) a nyár genom méretéhez képest ($2n = 4 \times = 38; 5,5 \times 10^8$ bp; $2C = 1,1$ pg).

A 682 fragment közül 4 volt polimorf (99,4 %-os genetikai azonosság) amelyek a nem transzformált kontroll nyárban valamint a 6Lgl transzgénikus klónban amplifikálódtak *Eco*-AGT / *Mse*-CCC primerpárral. Habár a fák hajlamosak a gyakori rügymutációra,

eredményeink azt bizonyítják, hogy a kísérleteinkben alkalmazott *P. × canescens* klónok a transzgén konstrukciótól eltekintve genetikailag azonosnak tekinthetők.



4. ábra Példa a transzgénikus szürkenyár 11ggs és 6Lgl klónjainak és a nem transzformáns kontroll fAFLP fragment analízise során kapott monomorf mintázatára. A szelektív AFLP primer pár az *Eco*-AGT / *Mse*-CAT volt.

6. táblázat Az fAFLP fragmentumok száma a *gsh1* transzgénikus *P. × canescens* 11ggs és 6Lgl klónjaiban valamint a nem transzformált kontroll klónban. A szelektív primerkombinációkat következőképpen alkalmaztuk: az *Mse*-CAC primert kombináltuk az *Eco*-AAT (a), *Eco*-ACC (b), és *Eco*-AGT (c) primerekkel; valamint az *Eco*-AGT primert kombináltuk az *Mse*-CAA (d), *Mse*-CAG (e), *Mse*-CAT (f), *Mse*-CCC (g), *Mse*-CCT (h), *Mse*-CGA (i), *Mse*-CGC (j), *Mse*-CTA (k) és *Mse*-CTC (l) primerekkel.

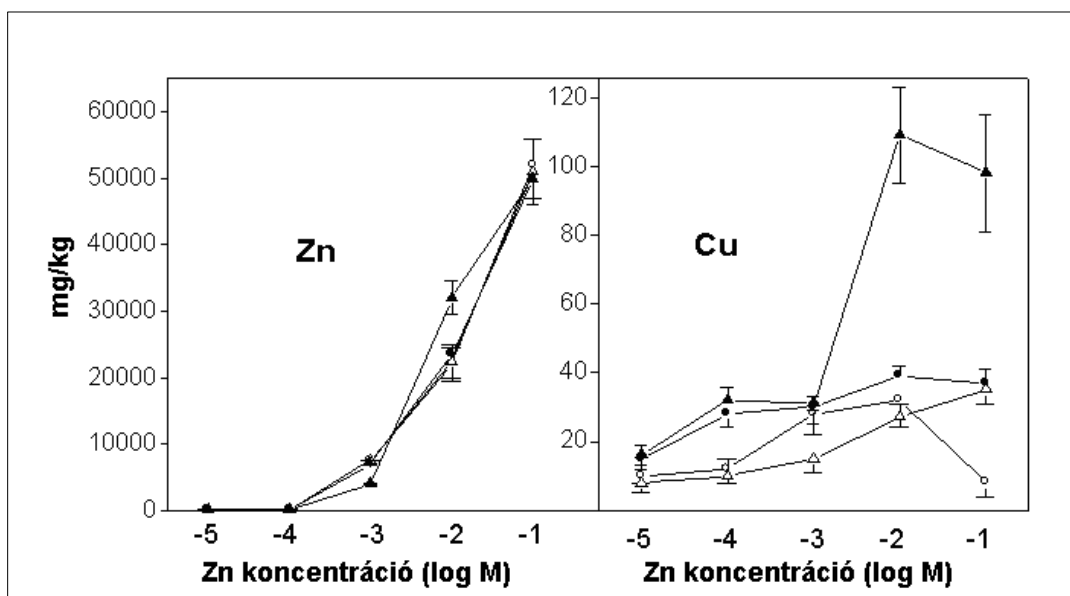
klóno	Az fAFLP fragmentumok száma szelektív primerpáronként (a-l)												
<u>k</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>f</u>	<u>g</u>	<u>h</u>	<u>i</u>	<u>j</u>	<u>k</u>	<u>l</u>	össz.
11ggs	25	6	17	30	25	35	16	14	11	9	17	21	226
6Lgl	25	6	17	30	25	35	19	14	11	9	17	21	229
kontro	25	6	17	30	25	35	17 ¹	14	11	9	17	21	227
ll	Összesen 682 közös AFLP fragment / 4 különböző = 99,4 % hasonlóság												

A cink stressz gsh1-transzgénikus szürkenyárban

A 10^{-1} M koncentrációjú Zn számos fitotoxikus és nekrotikus tüneteket okozott a kísérletben résztvevő összes klónon. A 10^{-2} M Zn koncentráció a levélkorongok fakulását okozta mindazonáltal minimális növekedési aktivitás megfigyelhető volt. Nem tapasztaltunk toxikus hatást alacsonyabb cink koncentrációknál (10^{-3} – 10^{-5} M) sem a transzgénikus sem a vad típusú *P. canescens* klónokban. A *P. nigra* klónok ettől némileg eltérő módon reagáltak a

ZnSO₄ adagolásra. A cinkkezelésre (10⁻² – 10⁻⁵ M) levélkorongok megbarnultak, növekedési aktivitásuk rendkívül alacsony volt. Az eredményeink szerint a *P. nigra* N-SL klónja sokkal érzékenyebb a ZnSO₄ kezelésre mint a *P. × canescens*.

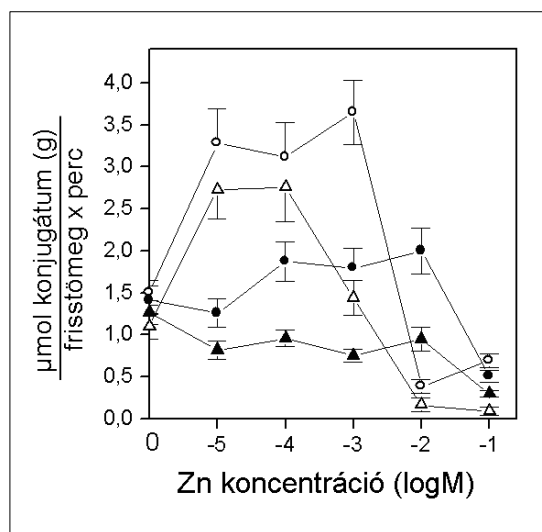
A levélkorongok nehézfém tartalmát a 5. ábra mutatja. Az endogén cink tartalom fokozatosan nőtt a növekvő exogén cinkadagolással arányosan. A transzgenikus és a vad típusú klónok cinktartalma nem mutatott eltérést. Az exogén ZnSO₄ adagolás serkentette a klónok Cu-felvételét a 11ggs klónban. A legnagyobb Cu-tartalmat 10⁻² M Zn-koncentráció mellett mértük. Ennél a Zn-koncentrációnál a 6Lgl klón réztartalma 122,7 %-os a 11ggs klóné 331,9 %-os volt a kontroll szürkenyárhoz képest. A 11ggs klónban 10⁻¹ M Zn-koncentráció mellett is 296,6 %-os volt a réztartalom, míg a 6Lgl klónban közel megegyezett a kontrollal. Elképzelhető hogy a nagyobb glutation tartalom nagyobb fitokelatin termelést eredményez. A jelentős réz akkumuláció a 11ggs klón alkalmazását jelzi in situ fitoremediációs célokra.



5. ábra A levélkorongok nehézfém tartalma (Zn, Cu), a transzgenikus *P. × canescens* 11ggs (-▲-) és 6Lgl (-●-) valamint a nem transzformált kontroll (-○-) klónjaiban valamint a *P. nigra* N-SL (-△-) klónjában, 21 napos ZnSO₄-ot különböző koncentrációban tartalmazó WPM táptalajon történő tenyésztést követően. Az átlagértékek és a szórás jelölve (n=3).

A korábbi méréseink szerint a 11ggs, 6Lgl és a kontroll *P. × canescens* klónok levelekben mérhető GST aktivitása között nincs különbség stresszmentes körülmények mellett. A jelen kísérletünkben ZnSO₄ terhelés mellett viszont markánsan növekedett a nem transzformált klónokban és kisebb mértékben a 6Lgl klón GST aktivitása, míg a 11ggs klónban nem változott az aktivitás (6. ábra). A legnagyobb eltérés a 10⁻³ M koncentrációnál jelentkezett, ahol a 11ggs klónban 20,6 %-os a 6Lgl klónban 49,2 % -os volt a GST aktivitás a kontroll szürkenyárhoz képest. Az enzimaktivitás növekedése a kisebb cink koncentrációnál jelentkezett (10⁻² – 10⁻⁵ M) viszont a rendkívül fitotoxikus 10⁻¹ M koncentrációnál a GST aktivitás teljesen lecsökkent az összes klónban. A transzgenikus klónokban mérhető kisebb indukálhatóság azt mutatja, hogy a vad típusú klónokban a ZnSO₄ kezelés nagyobb stresszt

okozott. Ezek szerint a nagyobb GST aktivitás összefüggésben van a megnövekedett detoxifikáló képességgel, mint ahogy ezt a Zn^{2+} -el kezelt nyárfa levélkorongoknál is tapasztaltuk.

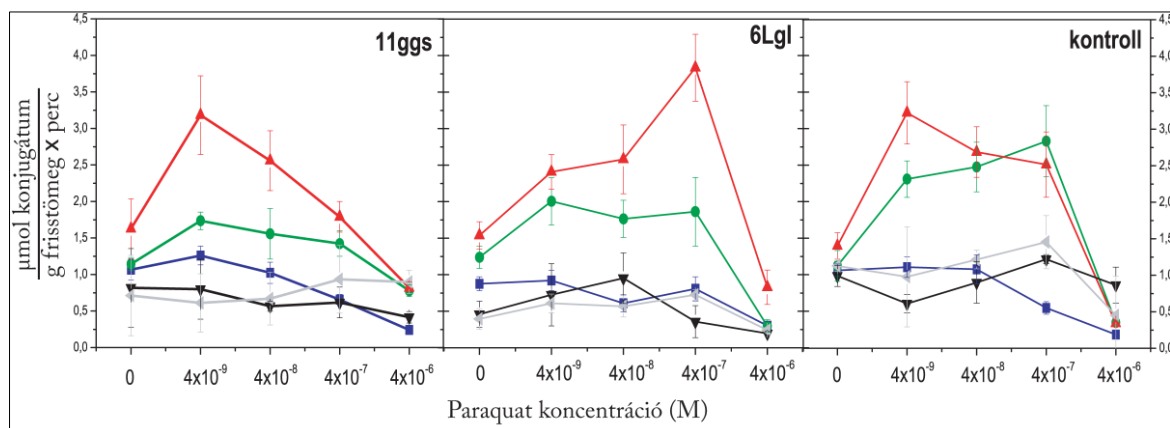


6. ábra A levélkorongok glutation S-transzferáz enzimaktivitása a transzgénikus *P. x canescens* 11ggs (-▲-) és 6Lgl (-●-), a nem transzformált kontroll (-○-) klónjaiban valamint a *P. nigra* N-SL (-△-) klónjában, 21 napos $ZnSO_4$ -ot különböző koncentrációban tartalmazó WPM táptalajon történő tenyésztést követően. Az átlagértékek és a szórás jelölve (n=3).

Paraquat stressz gsh1-transzgénikus szürkenyárban

Első lépésben a paraquat szubletális koncentrációjának meghatározását végeztük el. A 4×10^{-3} M – 4×10^{-6} M koncentrációkon a levélkorongok 8 nap elteltével mind kifakultak. A 4×10^{-7} M paraquat koncentrációnál a levélkorongok részlegesen kifehéredtek, fehér foltok jelentek a zöld levélen. Az összes többi alacsonyabb koncentrációnál vizuálisan nem tapasztaltunk eltérést a paraquat nélküli kontrollhoz képest, mindenhol zöldek maradtak a korongok. A fentiek alapján megállapítható hogy a nyár levélkorongok számára a 4×10^{-6} M paraquat koncentráció letális, a 4×10^{-7} M szubletális, a 4×10^{-8} M pedig már vitális, ezért a vizsgálatokat ebben a tartományban célszerű elvégezni. A paraquat működő fotoszintézis mellett hatékonyabban fejt ki hatását, viszont exogén szacharóz kiegészítés mellett a növény nincs rákényszerítve, hogy működtesse fotoszintetikus rendszerét, energiát a táptalajból is nyerhet. Ezért a fotoszintézis stimulálása érdekében a táptalajok szacharóz tartalmát az eredeti 2 %-os tartalomról néhány esetben lecsökkentettük. A fény szerepének tisztázására a tenyészetek egy részét sötétben inkubáltuk. A fényen tárolt 1 %-os és 2 %-os szacharóz koncentrációjú táptalajon tenyésztett nyár levélkorongok között vizuálisan nem észleltünk különbséget, mindkét esetben a várt mintázatot kaptuk, vagyis a 4×10^{-6} M paraquat koncentráció mellett a korongok kifakultak, míg a 4×10^{-7} M koncentrációnál a levélkorongokon fehér foltok jelentek, a többi esetben a kontrollhoz voltak hasonlóak. Ezzel ellentétben, a sötétben tárolt tenyészetek semelyik paraquat koncentrációnál sem fehéredtek ki. Tehát nem működő fotoszintetikus rendszer mellett a paraquat nem volt képes károsítani a kloroplasztiszt. Az 1 %-os és 2 %-os szacharózon tenyésztett, sötétben tárolt levélkorong tenyészetek között nem volt vizuálisan észlelhető a különbség.

A korongok stresszállapotának jellemzésére lemértük a korongokban lévő GST enzimek aktivitását (7. ábra). A 0,2 %-os szacharóz tartalomnál a paraquat koncentráció emelkedése fokozatos aktivitás csökkenést okozott a levélkorongok GST aktivitásában. Nagyobb szacharóz tartalom mellett a fényen tárolt tenyészeteknél a paraquat jelentős GST aktivitás indukált a 4×10^{-9} M - 4×10^{-7} M paraquat tartományban. A GST indukció szignifikánsan nagyobb volt a 2 %-os szacharóz tartalom mellett. Ez az indukció jelentkezett a mind a két transzgenikus és a kontroll szürkenyárban, habár a kiterjedése és a mértéke genotípusonként eltérő volt. A sötétben tárolt tenyészeteknél sem 1 %-os, sem 2 %-os szacharóz tartalom mellett a paraquat nem okozott GST indukciót, tehát az enzimaktivitás növekedése fényfüggő.

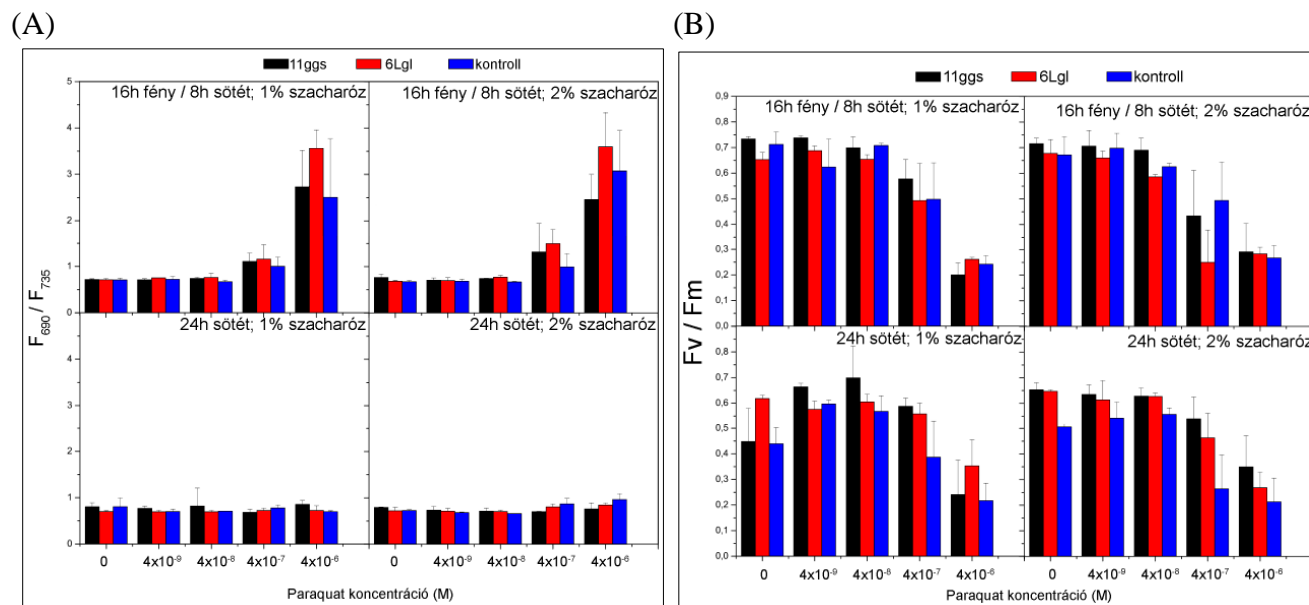


7. ábra A glutation S-transzferáz (GST) enzim aktivitása a transzgenikus *P. × canescens* 11ggs és 6Lgl, valamint a nem transzformált kontroll klónjaiból vágott levélkorongokban különböző koncentrációjú paraquat kezelés hatására. A tenyészeteket 16 h fény / 8 h sötét fotoperiódusban inkubáltuk három különböző szacharóz-kiegészítés mellett. Jelölések: -●- 0,2 % szacharóz fényben; -●- 1,0 % szacharóz fényben; -▲- 2,0 % szacharóz fényben; -▼- 1,0 % szacharóz sötétben; -◄- 2,0 % szacharóz sötétben. Az átlagértékek és a szórás jelölve (n=3).

A fotoszintetikus apparátus hatékonyságát klorofill fluoreszcencia mérésével jellemeztük. Az F_{690}/F_{735} arányszám fordítottan arányos a klorofill (a+b) tartalommal. Az itt kapott értékek az mutatják, hogy a paraquat magas koncentrációja csökkentette a levelek klorofill-tartalmát (8. ábra). Az eredmény egybevág a vizuálisan is tapasztalható korong-fakulással. A PS II fotokémiai rendszer hatékonyságát mutatja az F_v/F_m arányszám. Magas paraquat koncentráció (4×10^{-6} M; 4×10^{-7} M) jelentősen csökkentette a nyárklónok fotoszintetikus aktivitását (8. ábra). A két szacharóz koncentráció között nem tapasztaltunk jelentős különbséget. Érdekes módon a sötétben tárolt tenyészetek hasonló értékeket mutattak a fényben tárolt tenyészetekhez képest, ami azt mutatja, hogy a paraquat nem csak megvilágítás hatására képes toxikus hatást kifejteni a növényre. A transzgenikus klónok stressztűrő képességét összehasonlítva a két típus közül a néhány esetben a 11ggs klón teljesített némileg jobban (9,1 %-al volt jobb) de a különbség kevés esetben volt szignifikáns.

Az eredmények azt mutatják, hogy egyik GSH tartalmában megemelt transzgenikus nyárvonal sem mutatott nagyobb paraquat-rezisztenciát. A transzgenikus nyárakban a GSH szint a túltermelés ellenére sem elég nagy a paraquat okozta károsítás kivédésére. Megfelelő mennyiségű exogén GSH adagolásával ugyanis előidézhető a paraquattal szembeni rezisztencia. Érdekes módon a paraquat jelentős GST aktivitásnövekedést generált, ha a

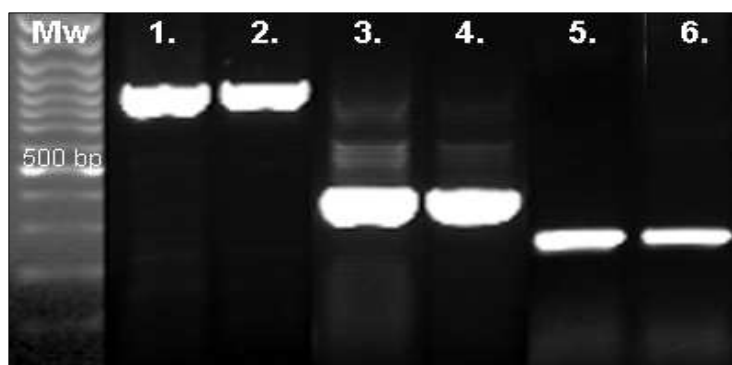
táptalaj 1 % vagy 2 % szacharózt tartalmazott. Szacharóz indukálta rezisztenciát atrazin herbiciddel kezelt *Arabidopsis*-ban figyeltek meg. Az exogén szacharóz hatása a GST indukcióra valószínűleg nem a fotoszintézis gátlása miatt kiesett metabolikus szacharóz kompenzációja miatt történik alacsony paraquat koncentrációnál. A védekező mechanizmus valószínűleg a több NADPH szintézisen alapul, amit a glükóz-6-foszfát dehidrogenáz enzim aktivitásának növekedése eredményezett. Másik magyarázat lehet, hogy a szacharóz adagolás beindítja a szénhidrát-kapcsolt folyamatokat, amely a nagyobb GST aktivitást eredményezi. A nagyobb exogén szacharóz adagolás a GST aktivitás indukcióján keresztül eredményesebb paraquat detoxifikációhoz vezet a nyár levélkorongokban.



8. ábra. (A) A fotoszintetikus aktivitás változása a klorofill fluoreszcencia F_v/F_m mérőszámával jellemezve a transzgénikus *P. x canescens* 11ggs és 6Lgl, valamint a nem transzformált kontroll klónjaiból vágott levélkorongokban különböző koncentrációjú paraquatot tartalmazó WPM táptalajon. A táptalajok 1 % illetve 2 % szacharózt tartalmaztak. Az inkubáció 16 h fény / 8 h sötét, illetve 24 h sötét fotoperiódusban történt. Az átlagértékek és a szórás jelölve (n=3). (B) A klorofill a és klorofill b tartalom változása a klorofill fluoreszcencia F_{690}/F_{735} mérőszámával jellemezve a különböző koncentrációjú paraquatot tartalmazó WPM táptalajon tenyésztett *P. x canescens* 11ggs és 6Lgl, valamint a nem transzformált kontroll klónjaiból vágott levélkorongokban. A táptalajok 1 % illetve 2 % szacharózt tartalmaztak. Az inkubáció 16 h fény / 8 h sötét, illetve 24 h sötét fotoperiódusban történt. Az átlagértékek és a szórás jelölve (n=3).

Génexpresszió vizsgálata paraquattal kezelt *gsh1*-transzgénikus nyárban

Génexpressziós vizsgálatokhoz szemikvantitatív RT-PCR-t alkalmaztunk. Templátként paraquattal kezelt nyár levélkorongokból kivont RNS-ből készített cDNS-t használtunk. A konstitutívan expresszálódó referencia génnek a riboszomális *26SrRNS* gént alkalmaztuk, amely azonos mértékű expressziót mutatott a kezelt és kezeletlen mintákban. A paraquat kloroplasztra kifejtett hatását az *rbcS* gén expresszióján keresztül vizsgáltuk mert ismert hogy az *rbcS* gén (RUBISCO kis alegység) expressziója a sejt kloroplasztartalmától függ. Kísérletünkben az *rbcS* gén kissé alacsonyabb aktivitást mutatott a paraquattal kezelt mintákban. A stressz indukálható glutation S-transzferáz enzim *gst* génje nem mutatott változást a kezelt mintákban (9. ábra).



9. ábra A *26SrRNS* (1.- 2.), az *rbcS* (3. - 4.) és a stressz reszponzív *gst* (5. - 6.) gének szemikvantitatív génexpresszió-analízise RT-PCR-rel, *Populus × canescens* paraquattal kezelt (2;4;6) és kezeletlen (1;3;5) mintáiban.

Az eredményeinkben megfigyelhető hogy az expressziós szintek kevésbé eltérőek, az értékeket számítógépes denzitométerrel számoltuk (7. táblázat). A sávok mért relatív intenzitását normalizáltuk a *26SrRNS* gén szintjéhez. Az így kiszámolt eredmények alapján sejtmagban kódolt *rbcS* gén expressziója 50 %-os csökkenést mutatott a paraquat károsító hatásának következményeként, valamint 120 %-os növekedést a *gst* gén expressziós szintjében. Az *rbcS* gén expressziójában bekövetkezett csökkenés megerősíti a klorofill fluorométerrel mért klorofill-tartalom csökkenést.

7. táblázat Paraquattal kezelt (4×10^{-7} M) és kezeletlen szürkenyár mintákban (*Populus x canescens*, 6Lgl) mért génexpresszió relatív értékei.

paraquat	relatív génexpresszió		
	<i>26S rRNS</i>	<i>rbcS</i>	<i>gst</i>
0,0 M	1,0	1,0	1,0
4×10^{-7} M	1,0	0,5	1,2

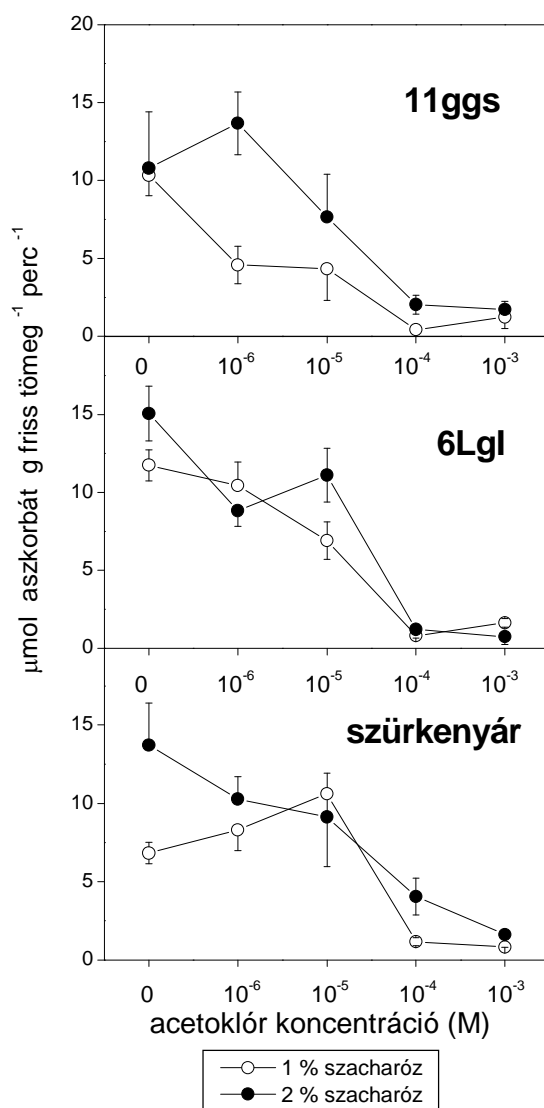
Acetoklór kezelés hatása méregtelenítő enzimek aktivitására

A gyomirtószer vizsgálatokat az acetoklór gyomirtószer által okozott stressz biokémiai vizsgálatával folytattuk nyárfa levélszövetekben. Az acetoklór a klóracetanilid típusú gyomirtószer közé tartozik, eltérően a paraquattól. A növényi sejtekben található GSH és a glutation S-transzferáz (GST) enzimaktivitás jelentős szerepet játszik a klóracetanilidek detoxifikálásában. Korábbi vizsgálatainkban már kimutattuk, hogy a γ -glutamil-cisztein szintáz (γ -ECS) enzimet kódoló génnel (*gsh1*) transzformált nyárfavonalak toleránsabbak a klóracetanilidek fitotoxikus hatásával szemben, mint a nem-transzformált nyárfa vonalak.

Három nyárfavonal steril leveleiből vágott levélkorongokat *in vitro* tenyészetekben az acetoklór gyomirtószerrel különböző koncentrációban tartalmazó táptalajain inkubáltuk (acetoklór: 10^{-6} – 10^{-3} M). Az acetoklór kezelés antidotálásához kétféle koncentrációban (1 és 2 %) szacharózt tettünk a táptalajba. A nyárfa korongok acetoklór lebontó ill. stressztűrőképességének jellemzésére meghatároztuk a levélkorongokban a GST aktivitást.

Megállapítottuk, hogy az acetoklór kezelés kis szacharóz koncentráció (1 %) mellett erősen toxikus hatású és koncentráció-függő módon jelentősen gátolja a GST enzim aktivitását. A magasabb (2 %) szacharóz tartalmú táptalajon nevelt valamint a transzgenikus 6 LgI fajta levélkorongjaiban a GST aktivitás szintén erősen lecsökkent az acetoklór gyomirtószer hatására. A ggs11 jelű hibrid esetében azonban alacsony (10^{-6} M) acetoklór koncentráció esetében érvényesült a szacharóz antidótum hatása.

Megvizsgáltuk ugyanebben a rendszerben az aszkorbát-peroxidáz enzim aktivitását is. Az aszkorbát-peroxidáz enzim a növények antioxidáns védekező rendszereinek kulcsenzime, ami a toxikus hidrogén-peroxid lebontásában játszik szerepet. Az aszkorbát-peroxidáz aktivitása a GST aktivitáshoz hasonlóan viselkedett (10. ábra).



10. ábra. A glutation S-transzferáz (GST) enzim aktivitásának változásai különböző nyárfavonalak levélszöveteiben acetoklór gyomirtószer különböző koncentrációival történt kezelések hatására, 1 illetve 2% szacharóz jelenlétében.

Az „X” szürkenyár fajtában viszont már 1% szacharóz tartalomnál is megfigyelhető volt az aszorbát-peroxidáz enzimaktivitás indukciója 10^{-6} – 10^{-5} M acetoklór koncentrációk esetében. Magasabb acetoklór koncentrációk esetében már a toxikus hatás dominált, az enzimaktivitás közel nullára csökkent. Összefoglalóan megfigyelhető volt, hogy a transzgenikus klónok, a bennük mérhető nagyobb GSH tartalom ellenére, nem voltak rezisztensebbek az acetoklór kezeléssel szemben, mint a nem transzformált vonalak. Magasabb szacharóz tartalmú táptalajok esetében egyes esetekben (ggs11 hibrid) a GST és aszorbát-peroxidáz enzim aktivitás-csökkenését csak kismértékben antidotálta a szacharóz.

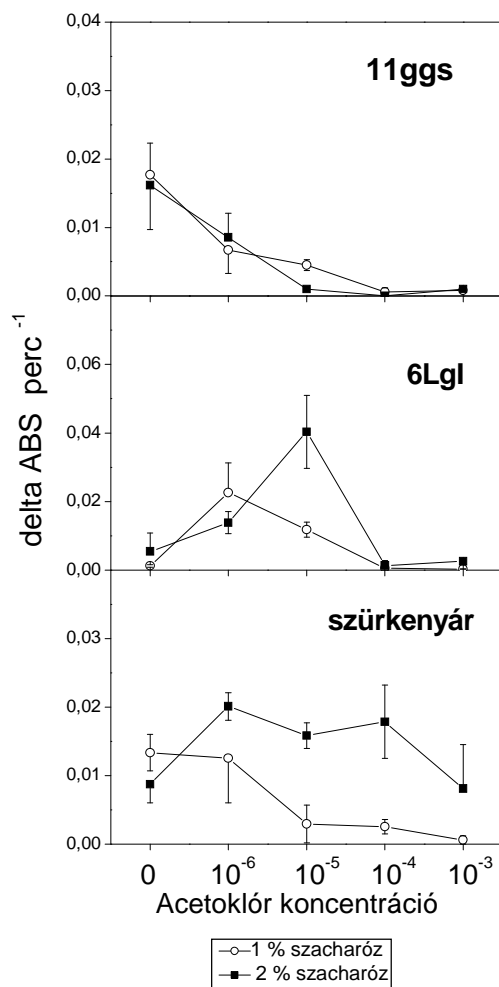
Acetoklór kezelés hatása a nyárfa ligninképződésére

A növényvédőszer lebontásában szerepet játszó GST enzim, valamint az antioxidáns hatású APOX enzim vizsgálata után egy új területre is kiterjesztettük stressz-vizsgálatainkat: a nyárfák lignin bioszintézisének egyik fontos lépésére. Abiotikus és biotikus stresszhatások, különösen a sebzés ill. fertőzések hatására fellépő oxidációs stressz következtében jelentősen indukálódik a lignin képződésben szerepet játszó fenil-propanoid reakcióút vonal. A sejtfalat erősítő lignin polimer fontos kiindulási anyagai a fahéjalkohol különböző származékai. Ezek bioszintézisében a legutolsó lépést a fahéjalkohol-dehidrogenáz (FDH, EC 1.1.1.195) enzim végzi, amely a különböző hidroxil- és metoxil-fahéjaldehid származékokat redukálja a megfelelő alkoholokká. Az FDH aktivitása jelentősen indukálható különböző abiotikus és biotikus stressz-reakciókban. Többek között ózon-kezelt nyárfa szövetekben is kimutatták a FDH aktivitás jelentős emelkedését.

Az acetoklór gyomirtószernek a lignin bioszintézisre gyakorolt hatását megvizsgáltuk különböző nyárfavonalak leveleiben az FDH aktivitás mérésével. Az enzimreakció reverzibilis volta lehetővé teszi a fordított irányú enzimreakció mérését is, így a méréseink során a koniferil-alkoholnak a koniferil-aldehiddá történő enzimreakcióját mértük. A koniferil-alkohol oxidációjához az enzim NAD⁺ és NADP⁺ koenzimet is felhasználhat, a jelenlegi vizsgálataink során a NADP⁺ koenzimet használtuk az enzimaktivitások meghatározásához. A nyárfa levélkorongokat szilárd WPM táptalajon inkubáltuk különböző szacharóz és acetoklór koncentrációk mellett, majd spektrofotometriásan, 340 nm-en határoztuk meg az FDH aktivitásokat. A vizsgált nyárfa levelek fahéjalkohol-dehidrogenáz aktivitását erősen befolyásolta az acetoklór kezelés magasabb szacharóz-tartalom mellett. Alacsony cukortartalom (1%) esetében az acetoklór általában nem változtatta meg vagy gátolta az FDH aktivitást, míg 2 % cukortartalom esetében az FDH aktivitás jelentős indukcióját észleltük (11. ábra). Különösen jelentős FDH enzimaktivitás-indukciót tapasztaltunk a nem-transzgenikus szürkenyár levelek szöveteiben. A kísérleteink szerint az FDH enzimaktivitás mérése szintén jól használható stressz-indikátor nyárfa szövetek stressz-érzékenységének vizsgálatához.

Populus nigra sejtklónok mikroszatellita diverzitása

A feketenyárnak számos különböző klónja, szomatikus klónja és hibridje ismeretes, amelyek genetikai alapanyagként szolgálnak a nyárnemesítéshez. A kísérlet célja is az volt hogy antéra eredetű szomatikus klónokból új SSR-típusokat állítsunk elő. Az N-SL és N-309 feketenyár szomaklónok elemzését öt SSR primerrel végeztük el: WPMS-02 (5 allél), WPMS-04 (6 allél), WPMS-06 (2 allél), WPMS-20 (6 allél) és PTR-04 (1 allél). Kettő primerpárral monomorf mintázatot kaptunk egy (194 bp; PTR-04) illetve két (168 és 174 bp, WPMS-06)



11. ábra. A fahéjalkohol-dehidrogenáz (FDH) enzim aktivitásának változásai a nem transzformált szürkenyár (*Populus canescens*), és két génmódosított vonal (*Populus tremula* X *Populus alba*) (11ggs and 6Lgl) levélszöveteiben acetoklór gyomirtószer különböző koncentrációival történt kezelések hatására.

allállal. Az öt primerrel összesen 20 allélt detektáltunk. A módszer megbízhatóságának ellenőrzésére a WPMS-20 lókuszon kapott 244 bp hosszúságú allélt két irányból megszakévtattuk. A visszakapott szekvencia 6 bázis kivételével megegyezett a Genbank AJ297293 számú szekvenciájának részletével leszámítva az ismétlődő szekvenciariészlet mennyiségét. Az ismétlődő szekvenciamotívum (TTCTGG_n) a szekvenciált mintában a 3x ismétlődik míg az adatbázisban szereplő mintában 8x az alábbiakban a 108. bp pozíciótól kezdődően. (12. ábra) A báziseltérések SNP helyeket jelölnek. Négy esetben tranzícióval történt báziscsere (T↔C vagy G↔A) és két esetben transzverzióval tehát purinbázis és pirimidinbázis cserélődött. Ezek a változások a genetikai polimorfizmus kialakulásának kezdeti lépéseit jelentik, amelyet jelen esetben fajon belül is sikerült detektálnunk. Egy következő munka részét képezhetné annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy az egyes szomaklónok között mekkora mértékű SNP eltérés van.

<i>primer/a</i>		<i>gtgcgcacatctatgactatcg</i>	
AJ297293	1	GTGCGCACATCTATGACTATCGAAGCCAGTGACCCAGTATGTCGTGCTTC	50
WPMS-20	1 <u>T</u>	50
AJ297293	51	AATGTGATATGTTTCACAACCAACATCGTCTTGCTCTGCCAAGAATGGTA	100
WPMS-20	51 <u>T</u> <u>A</u>	100
AJ297293	101	ACCCTAG <u>TTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGG</u>	156
WPMS-20	101 <u>G</u> <u>-----</u>	156
AJ297293	157	TTTGTA TAGCCATATTTCTTTTCCATGCGCCAACAAATTTGG	200
WPMS-20	157 <u>G</u>	200
AJ297293	201	TAAATTAATTGATAACTTGAAAGAAGAGAGATGCCCGGAGAATTACAAGAT	253
WPMS-20	201 <u>G</u> <u>AA</u>	253
<i>primer/b</i>		<i>agatgcccgagaattacaagat</i>	

12. ábra SNP (aláhúzott) és (ttctgg)₅-delécio (árnyékolt) a WPMS-20 lókuszon az NS-L.30 klónban a génbanki adat (AJ297293) alapján.

Az ALF Express futtatást és értékelést követően fragmentek léte és nem léte alapján SPSS 11 programmal klaszter analízist és dendrogrammot készítettünk. Az SSR allélek elkülönítették egymástól a két nyárklónt (N-SL, N-309). Az N-SL klónon belül további öt az N-309 klónon belül három alcsoport jött létre. Az öt SSR marker közül három mutatott polimorfizmust (WPMS-02; WPMS-04; WPMS-20) a mikroszatellita lókuszon. A huszonkilenc N-SL szomaklón között 5 klóntípus különült el. Huszonhárom azonos genetikai mintázatot mutatott a kontroll klónnal, külön csoportba került a 17. és 24. valamint a 2. és 14., és egytagú csoportba kerültek a 10. és 15. klónok. A szomaklónoknak összesen 26%-a változott meg. A hat darab N-309 szomaklón között három klóntípus különült el, öt klón egy csoportba került a kontrollal és egytagú csoportot alkotnak a 35. és 36. klónok a változás 33%-os (8. táblázat). A stabilitás a nyárgenom kis méretével magyarázható ($2n = 4x = 38$; 5.5×10^8 bp; $2C = 1.1$ pg). Az ALF-SSR egy jó megbízhatóságú módszernek bizonyul a feketenyár szomatikus klónok mikroszatellita variációinak elkülönítésére. A módszer alkalmas lehet a nyár genotípusok fitoremediációra való képességének markerezésére is.

8. táblázat Az N-SL (1-29 és kontroll: 30) és N-309 (31-36 és kontroll: 37) feketenyár (*P. nigra*) egyedekről származó szomaklónok SSR alléljeinek genetikai polimorfizmusa öt mikroszatellita lókuszon (WPMS-02, WPMS-04, WPMS-06, WPMS-20 és PTR4), a mikroszatellitek ismétlődő szekvenciégségei, az allélek pontos méretei és a PIC (polymorphism index content) értékek

SSR lókusz és ismétlődő szekv.		Mikroszatellita markerek																				
		WPMS02				WPMS04				WPMS06			WPMS20				PTR04					
		(GA) ₂₃				(GT) ₂₅				(GT) ₂₄			(TTCTGG) ₈				(TC) ₁₇					
Allelélok	200	214	228	240	244	242	248	256	260	262	286	168	174	225	231	238	244	251	257	194		
Méret (bp)	200-244				242-268				168-174			224-257				194						
PIC érték	0,600				0,567				0,500			0,680				0,00						
Klónok																						
1	2 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
2	4 N-SL	200	-	-	240	-	-	248	256	-	-	-	168	174	-	-	-	244	251	-	-	194
3	5 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
4	6 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
5	7 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
6	10 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
7	14 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
8	15 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
9	16 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
10	17 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	286	168	174	-	231	-	-	251	-	-	194
11	18 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
12	19 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
13	20 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
14	22 N-SL	200	-	-	240	-	-	248	256	-	-	-	168	174	-	-	-	244	251	-	-	194
15	23 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	260	-	-	168	174	225	-	-	-	-	-	-	194
16	28 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
17	41 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	260	-	286	168	174	225	231	-	-	-	-	-	194
18	42 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	286	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
19	43 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
20	44 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
21	45 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
22	46 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
23	47 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
24	49 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	260	-	286	168	174	225	231	-	-	-	-	-	194
25	51 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
26	54 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
27	55 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
28	59 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
29	60 N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
30	C - N-SL	200	-	-	240	-	-	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	244	-	-	194	
31	97 N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
32	98 N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
33	99 N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
34	101 N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
35	102 N-309	200	214	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
36	104 N-309	200	214	228	-	244	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
37	C - N-309	200	-	228	240	-	242	-	-	-	262	-	168	174	-	-	238	-	-	257	194	
Összesen		37	2	7	36	1	7	2	2	3	32	4	37	37	3	3	31	26	3	7	37	