

canescens) szelekciója és alkalmazása fitoremediációban

Bittsánszky András^{1,2} – Gyulai Gábor² – Gullner Gábor¹ – Tóth Zoltán –
Kiss József² – Szabó Zoltán² – Kátay György¹ – Heszky László² – Kőmíves
Tamás¹

¹MTA Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest,

²Szent István Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Gödöllő

E-mail: Gyulai.Gabor@mkk.szie.hu

Összefoglalás

Paraquat (*syn.*: metilviologén) toleráns nyárfa (*Populus x canescens*) klónok szelekcióját végeztük el *in vitro* kultúrában. A szintetikus talaj összetétele: WPM (Woody Plant Media) tápsók, 1% szacharóz, 0,8 % agar 1 mg/l benziladenin, 0,2 mg/l naftilecetsav és paraquat koncentráció sor (2×10^{-6} M, $1,47 \times 10^{-6}$ M, $9,3 \times 10^{-7}$ M, 4×10^{-7} M) volt. A regeneránsokat szelekciós táptalajon történő tesztelés után felszaporítottuk (mikroszaporítás), gyökeresítettük, majd üvegházban felneveltük. A molekuláris (RT-qPCR) és biokémiai elemzések (aszorbát peroxidáz, glutation peroxidáz, glutation S-transzferáz, lipoxigenáz) igazolták egy rendkívül stabil paraquat toleráns klón sikeres szelekcióját. A klónokat az *in vitro* vizsgálatokat követően *in situ* (Fűzfőgyártelep) teszteljük gyomirtószer maradványok toleranciájára.

Summary

Paraquat (*syn.*: methylviologen) tolerant poplar (*P. x canescens*) clones (PQT) were selected in *in vitro* cultures at concentration series of paraquat (2×10^{-6} M, $1,47 \times 10^{-6}$ M, $9,3 \times 10^{-7}$ M, 4×10^{-7} M). After testing on tissue culture media, regenerants were micropropagated. After rooting, PQT-clones were transplanted to a greenhouse. PQT clones showed significantly higher *gst* gene expression than wild type (WT) analyzed by RT-qPCR (quantitative reverse transcriptase PCR). For functional analysis enzyme activities of GST (glutathione S-transferase), APOX (ascorbate peroxides), GR (glutathione reductase), and LOX (lipoxygenase, pH 8.0) were determined. After rooting, PQT-clones were transplanted in glass houses, followed by field performance analyses for phytoremediation (environmental clean up using plants) capacity in heavily contaminated area at Balatonfűzfő, Hungary

Bevezetés

A paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium vagy N,N'-dimethyl-L,L'-dipyridylum; *syn.*: methyl viologen; $[C_{12}H_{14}N_2]^{2+}$) egy totális, kontakt hatású, elektronakceptor hatásmechanizmusú, PS I- gyomirtószer. Emberre is rendkívül toxikus, ennek ellenére – főleg alacsony ára miatt – széles körben elterjedt (több mint 130 országban alkalmazzák), illetve használták. Hatását elsősorban a fotoszintetikus elektron-transzportlánc elektronjainak befogásán keresztül fejti ki (LEHOCZKY et al., 1992; SZIGETI et al., 2001). A bivalens paraquat kation a

fotoszintetikus elektront befogja, majd a kloroplasztiszban nagy mennyiségben jelen lévő O₂ molekulára viszi, amellyel reaktív oxigénformák jönnek létre. A folyamat során a paraquat visszaalakul, és újabb reakciót indukál. A folyamat eredménye, hogy a fotoszintetikus elektron átadó lánc, a NADPH redukció és a fotofoszfóriláció nem tud végbemenni, a Calvin-ciklus enzimeit gátlódnak (DODGE, 1994). A reakció folyamatos ismétlődése oxidatív stresszt, membránkárosodást, klorofill degradációt és deszikkációt okoz.

A paraquat gyomirtó szer számos antioxidáns védekező reakciót indít be. Glutathion (GSH) jelenlétében a paraquat gerjesztette oxidatív stressz a GSH elektronátadásán keresztül, a GSH-GSSG redoxrendszeren keresztül (szabadgyökök redukciója) küszöbölődik ki.

Paraquat herbiciddel szembeni, nagy antioxidáns kapacitású növények *in vitro* szelektált klónjai (FURUSAWA et al., 1984) az oxidatív stresszel szembeni rezisztenciát is mutattak, melyet többféle biotikus és abiotikus stressz idézett elő (BARNA et al., 1993). Ezekben a kísérletekben, a paraquat-rezisztens növényekben a betegséggel előidézett nekrotikus tünetek visszaszorultak. Igazolódott, hogy a paraquat-rezisztens növény antioxidáns kapacitása szignifikánsan nagyobb a kontroll (fogékony) növényekénél (SHAALTIEL et al., 1988; GULLNER et al., 1991; BARNA et al., 1993; GULLNER et al., 1995). A burgonyában végzett korábbi kísérleteinkben (KIRÁLY, 2002; VICZIÁN et al., 2004) paraquat-rezisztens burgonyaklónokat szelektáltunk, amelyek többféle burgonyabetegséggel szemben mutattak rezisztenciát, megemelt antioxidáns kapacitással. A módszerrel nagy hatékonyságú növénynemesítési szelekciós eljárást vezettünk be, amellyel multirezisztens, nagy antioxidáns aktivitású növényeket lehet előállítani. A hosszú életidejű fajok között azonban kevés eredmény áll rendelkezésre, ezért munkánkban nagy fitoremediációs kapacitású, paraquat-rezisztens szürkenyár (*Populus x canescens*) klónok előállítása volt a célunk.

Anyag és módszer

Növényanyag: A vizsgálatokhoz a szürkenyár-hibrid (*Populus tremula* × *Populus alba* = *Populus* × *canescens*) klónjait alkalmaztuk (INRA No.717-1-B4) (ARISI et al., 1997; NOCTOR et al., 1998). A klónok felnevelése *in vitro* módszerrel történt (KISS, 1999). A regenerálódott hajtásokat gyökérindukáló táptalajra helyeztük. A gyökeres növényeket cserépbe ültettük, majd a megfelelő méret elérése után tesztelésre szabadföldre telepítettük (Fűzfőgyártelep).

***In vitro* táptalajok:** A nyárnövények *in vitro* fenntartásához, mikroszaporításához, valamint a stresszkísérletekhez WPM (Woody Plant Media) táptalajt (LLOYD & MCCOWN, 1980) használtunk. Hajtásregeneráláshoz valamint a levélkorong-tesztekhez a táptalajt a következő hormonokkal

egészítettük ki: 1 mg/l benziladenin, 0,2 mg/l naftilecetsav. A táptalajok pH értékét 5,6-5,8 közé állítottuk be, autoklávozással sterilizáltuk (KISS, 1999).

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, valamint paraquat nélküli kontroll. A sterilre szűrt paraquat oldatot az autoklávozott táptalajhoz szilárdulás előtt adagoltuk. Az elkészített, agarral szilárdított táptalajokat petricsészékbe öntöttük. Steril, két hónapos nyárfá hajtások fiatal leveleiből vágott levélkorongokat helyeztünk a tesztelő táptalajokra, színükkel felfelé, kezelésként 15-öt (GYULAI et al., 1995). A tenyészeteket $22 \pm 2^\circ\text{C}$ -on 16 h fény ($40 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) / 8 h sötét fotoperiódusú fényszobában 8 napon keresztül inkubáltuk (GULLNER et al., 2005).

Molekuláris biológiai módszerek. DNS-izolálás: Genomikus DNS izolálást 0,1 g friss levélszövetből CTAB (cetiltrimetilammónium bromid) extrakciós pufferrel végeztük (MURRAY & THOMPSON, 1980; DOYLE & DOYLE, 1990) *RNS izolálás, cDNS szintézis:* Az RNS izolálást Absolutely RNA Miniprep (# 400800, Stratagene, USA - Biomedica, Hungary) Kittel végeztük. Az izolálás előtt RNáz-mentes vizet készítettünk: vízben 0,01% dietil-pirokarbonátot oldottunk egy éjszakán át, majd autoklávoztuk. A totál RNS oldatok koncentrációját és minőségét spektrofotométerrel határoztuk meg. A totál RNS-ből egyszálalás cDNS-t szintetizáltunk RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) használatával. A cDNS szintézist 42°C -on 60 percig végeztük, majd a reakciót 70°C -on 10 perces reakcióidővel állítottuk le. A mintákat jégen tároltuk vagy azonnal qPCR reakciót indítottunk velük. *qPCR, Ct értékek (threshold cycle):* A qPCR reakciókat Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Australia – Izinta, Hungary) készüléken futtattuk le. A vizsgált gének expressziós szintjeit a $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ módszerrel határoztuk meg (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Biokémiai vizsgálatok: A glutation S-transzferáz enzim aktivitását spektrofotometriás módszerrel mértük meg CDNB-t alkalmazva szubsztrátként (HABIG et al., 1974). Három független mérésből kapott értékeket t-próbával hasonlítottuk össze a kontroll értékeivel. Az 5% fölötti eltéréseket szignifikánsnak fogadtuk el.

Eredmények és megvitatásuk

Az *in vitro* szelekciós kutatások elmúlt éveiben kevés figyelem fordult a fás növényekre, a regeneráció nehézségei miatt. Máig nem sikerült a tudományban stabil paraquat-toleráns nyárfaklónokat szelektálni, ezért kísérleteink első részében a paraquat biológiai hatását vizsgáltuk, valamint meghatároztuk a letális és szubletális dózisokat levélkorong tenyészetben.

A 4×10^{-3} M – 4×10^{-6} M koncentrációkon a levélkorongok 8 nap elteltével mind kifehéredtek. A 4×10^{-7} M paraquat koncentrációnál a levélkorongok csak részlegesen fehéredtek ki (szubletális dózis), elszórt fehér foltok jelentkeztek 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 a szubletális, a 4×10^{-8} M pedig már vitális, ezért a vizsgálatokat a szubletális tartományban végeztük.

A szubletális dózison (4×10^{-7} M) sikeres volt a paraquat toleráns klónok szelekciója *in vitro* hajtásteresztben. A regeneránsokat gyökeresítő táptalajra helyeztük, majd a gyökeres példányokat hajtássokszorozással (GYULAI et al., 1995) felszaporítottuk, és hajtásteresztben ellenőriztük a paraquat-tolerancia (10^{-7} , 4×10^{-7} , és 10^{-6} M) stabilitását (2. ábra). A hajtástenyészet kísérletekben a *gshI* transzgenikus klónokat is alkalmaztuk génpiramidálás (géntelítés) céljából. A túlélő növények arányát százalékban fejeztük ki (1. táblázat).

1. táblázat. Paraquat toleráns klónok szelekciója szürkenyár hajtástenyészetben

paraquat (M)	vad típus (%)	<i>gshI</i> transzgenikus (%)
0,00	96,0 %	97,0 %
$3,3 \times 10^{-7}$	20,0 %	24,0 %
$6,6 \times 10^{-7}$	5,0 %	4,8 %
$9,9 \times 10^{-7}$	1,6 %	1,9 %

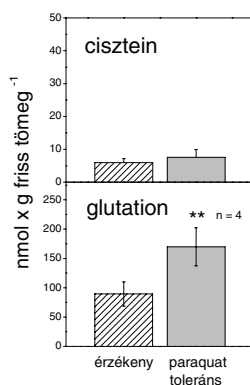
Megvizsgáltuk a nyárfa szövetek antioxidáns kapacitását, amely az egyik meghatározó paraméter a növények általános stressz-tűrőképességében. Elsőként három meghatározó antioxidáns enzim aktivitását vizsgáltuk a paraquat-toleráns és kontroll nyárfa levélszövegeiben. Ezek az antioxidáns enzimek az oxidáló hatású hidrogén-peroxidot, valamint különböző szerves peroxidokat képesek lebontani a növényi sejtekben. Az enzimaktivitásokat spektrofotometriásan mértük (GULLNER et al., 2005). A paraquat-toleráns és normál nyárfák kezeletlen leveleinek aszkorbát-peroxidáz, glutation-reduktáz és glutation S-transzferáz aktivitása között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (2. táblázat).

A paraquat-toleráns és normál nyárfalevelek cisztein és glutation (GSH) tartalmát HPLC módszer segítségével a monobromobimán származékképző reagens alkalmazásával határoztuk meg.

2. táblázat. Glutation S-transzferáz, aszkorbát-peroxidáz és glutation-reduktáz enzimek aktivitása paraquat toleráns és vad típusú klónokban.

Enzim	Paraquat-toleráns	Vad típusú (érzékeny)
	(PQT)	(WT)
Aszkorbát-peroxidáz	8,2 ± 2,6	7,6 ± 0,9 $\mu\text{mol g FW}^{-1} \text{min}^{-1}$
Glutation reduktáz	0,41 ± 0,09	0,32 ± 0,08 $\mu\text{mol g FW}^{-1} \text{min}^{-1}$
Glutation S-transzferáz	1,8 ± 0,5	1,5 ± 0,4 $\mu\text{mol g FW}^{-1} \text{min}^{-1}$

A glutation (GSH) -tartalom lényegesen magasabb volt a paraquat toleráns (PQT) vonal leveleiben, ami arra utal, hogy ennek a növénynek fokozottabb a toleranciája oxidációs stresszel és különböző GSH segítségével lebomló herbicidekkel szemben (acetoklór, metolaklór, atrazin, aciflorfen stb). A levelek ciszteintartalma nem tért el szignifikáns módon a két vonal levelei között (1. ábra).

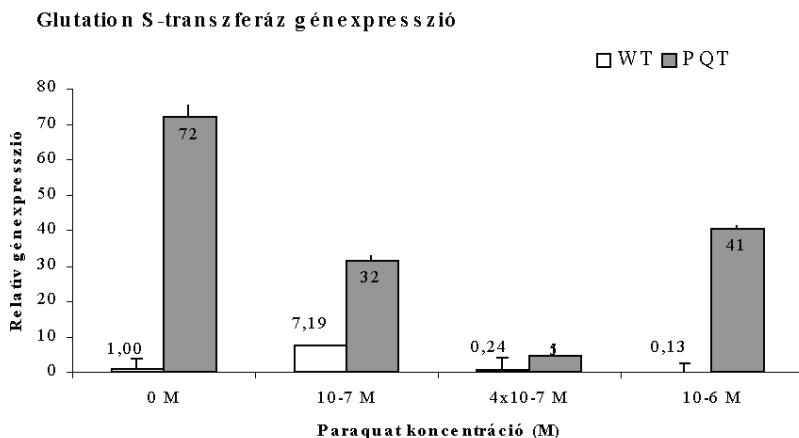


1. ábra. Paraquat-toleráns (PQT) és érzékeny (WT) nyárfalevelek cisztein- és glutaciontartalma

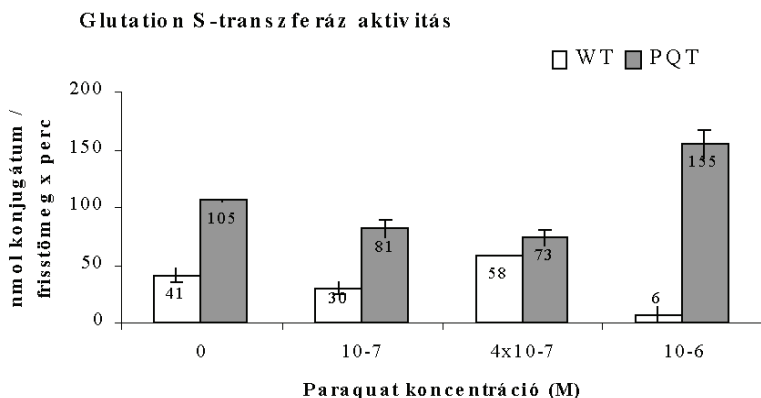
A paraquat-toleráns (PQT) klónok bizonyítására és jellemzésére levélkorong tesztet alkalmaztunk. A két nyárfavonal steril tenyészetéből vágott levélkorongokat *in vitro* tenyésztetben a paraquat gyomirtószert tartalmazó WPM táptalajon tenyésztettük (paraquat: 4×10^{-7} M.) Három hetes tenyésztési időt követően a paraquatot tartalmazó táptalajon a vad típusú (WT) levélkorongok megbarnultak, míg a toleráns vonalak zöldek maradtak.

A teszt során mértük a *gst* gén expresszióját és a *gst*-kódolt enzim-fehérje, a GST enzimaktivitást. A paraquat toleráns klón *gst* génexpressziója stressz mentes (paraquat-mentes táptalaj) körülmények között 71,4-szeres mértékű *gst* expressziót mutatott, amely aktivitás 10^{-7} M paraquat-stresszben is magasabb

volt a kontrollnál (WT) (közel négyszeres: 7,1 / 31,5), míg a szubletális koncentrációban (4×10^{-7} M) közel 22-szeres (0,2 / 4,5). A „fehérítő” koncentrációban (10^{-6} M) a kontroll (WT) vonal minimális *gst* aktivitása mellett (0,1 relatív egység) a paraquat-toleráns klón még 40,5-szeres *gst* expressziót mutatott (2. ábra). Ez utóbbi eredmény jelzi, hogy a kloroplaszt-mentes (kifehéredett) PQT mintákban a *gst*-expresszió, mint vészreakciót még igen magas mértéket mutat, amely együtt járt a GST enzim funkciójának extrém mértékű növekedésével (154,1 nM konjugátum) (3. ábra) is.



2. ábra. A *gst* gé n exp res sz ió (RT-qPCR) a szürkenyár (*Populus x canescens*) termész etes (WT) és paraquat-tolerá ns (PQT) klónjában (n=6) három konc en tr á c iós haj tás tes z tben 10^{-7} M, 4×10^{-7} M és 10^{-6} M paraquat mellet t



3. ábra. A GST enzim ak tív itása a paraquat-tolerá ns (PQT) és a kontroll (WT) szürkenyár klónok ellenő rző haj tás tes z tjeiben, háromféle paraquat konc en tr á c ió mellet t (10^{-7} M, 4×10^{-7} M, 10^{-6} M), 1% szacharóz tartalmú *in vitro* táptalajon

Miután laboratóriumi körülmények között bebizonyosodott, hogy a paraquat toleráns vonalak alkalmasabbak lehetnek fitoremediációra, ezeket a vonalakat mikroszaporítással felszaporítottuk, majd szabadföldi kiültetésre kerültek. A növények szabadföldi értékelése jelenleg is folyik.

Következtetések

A laboratórium körülmények között szelektált és fitoremediációs területre kiültetett paraquat-toleráns szürkenyár klónok hatékony biológiai eszközei az új ököremediációs eljárásoknak, és egyben alternatív megoldást biztosítanak a GMO kontra nem-GMO kérdéshez a talajvédelmi alkalmazásban.

Irodalomjegyzék

- ARISI, A. C. M., NOCTOR, G., FOYER, C. H. & JOUANIN, L. (1997): Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. *Planta* **203**. 362-372.
- BARNA, B., ÁDÁM, L. & KIRÁLY, Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* **80**. 420-422.
- DODGE, A. D. (1994): Herbicide action and effects on detoxification processes, In: Causes of photoactive stress and amelioration of defense system in plants. (Eds.: FOYER, C. H. & MULLINEAUX, P. M.). p. 219-236. CRC Press. Boca Raton, FL.
- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**. 13-15.
- FURUSAWA, I., TANAKA, K., THANUTONG, P., MIZUGUCHI, A., YAZAKI, M. & ASADA, K. (1984): Paraquat Resistant Tobacco Calluses with Enhanced Superoxide Dismutase Activity. *Plant Cell Physiol.* **25**. 1247-1254.
- GULLNER, G., KÖMIVES, T. & KIRÁLY, L. (1991): Enhanced inducibility of antioxidant systems in a *Nicotiana tabacum* L. biotype results in acifluorfen resistance. *Z Naturforsch C* **46**. 875-881.
- GULLNER, G., KOMIVES, T. & GABORJANYI, R. (1995): Differential alterations of glutathione S-transferase enzyme activities in three sorghum varieties following viral infection. *Z Naturforsch C* **50**. 459-460.
- GULLNER, G., GYULAI, G., BITTSÁNSZKY, A., KISS, J., HESZKY, L. & KÖMÍVES, T. (2005): Enhanced inducibility of glutathione S-transferase activity by paraquat in poplar leaf discs in the presence of sucrose. *Phyton - Annales Rei Botanicae* **45**. 39-44.
- GYULAI, G., KISS, J., JEKKELE, Z., KISS, E. & HESZKY, L. E. (1995): A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation *in vitro*. *J Plant Physiol* **145**. 379-382.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. (1974): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**. 7130-9.
- KIRÁLY, Z. (2002): Az oxidatív stressz és az antioxidánsok szerepe a növény/patogén kapcsolatokban. Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények - *Acta Agraria Debreceniensis* **9**. www.date.hu/acta-agraria/2002-09/kiraly.pdf.

- KISS, J. (1999): A nyárfa nemesítése biotechnológiai módszerekkel (PhD Disszertáció), Szent István Egyetem, Gödöllő, pp. 98.
- LEHOCZKY, E., LASKAY, G., GAAL, I. & SZIGETI, Z. (1992): Mode of action of paraquat in leaves of paraquat-resistant *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Plant, Cell & Environment* **15**. 531-539.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001 **25**. 402-408.
- LLOYD, G. & MCCOWN, B. H. (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc.* **30**. 421-427.
- MARONE, M., MOZZETTI, S., RITIS, D. D., PIERELLI, L. & SCAMBIA, G. (2001): Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* **3**. 19-25.
- MURRAY, M. G. & THOMPSON, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**. 4321-4325.
- NOCTOR, G., ARISI, A. C. M., JOUANIN, L. & FOYER, C. H. (1998): Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiology* **118**. 471-482.
- SHAALTIEL, Y., GLAZER, A., BOCION, P. F. & GRESSEL, J. (1988): Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide, and ozone. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **31**. 13-23.
- SZIGETI, Z., RÁ CZ, I. & LÁ SZTITY, D. (2001): Paraquat Resistance of Weeds - The Case of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Z Naturforsch C* - **56**. 319-328.
- VICZIÁN, O., HARRACH, B. D., BARNA, B., & KIRÁLY, Z. (2004): The enzymatic background of paraquat tolerant potato lines *Acta Physiol Plant* **26**:227