

## DHAC-indukált transzgén-reaktiváció a 35S-*gshI* GMO szürkenyárban (*Populus × canescens*)

Gyulai Gábor

Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,

Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

gyulai.gabor@mkk.szie.hu

### ÖSSZEFOGLALÁS

A transzgénikus szürkenyár (*Populus × canescens*) klónokba (6lgl, 11ggs) épített *gshI*-transzgén (*E. coli*), valamint az identikus (endogén) nyár *gshI* gén relatív expressziós szintjét határoztuk meg qRT-PCR analízissel (kvantitatív reverz transzkriptáz polimeráz láncreakcióval) demetilációs hatású DHAC (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) kezelés indukciójával, a konstitutívan expresszálandó *α*-tubulin gén expressziójának kontrolljában. A kiértékelésben  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  módszert alkalmaztuk. A 6lgl klónban a *gshI* transzgén expressziója extrém magas értéket mutatott (13,5-szeres) a 11ggs (1,0) klónhoz képest, amely érték tovább növekedett a DHAC demetilációs indukciójával ( $10^{-4}$  M, 7 napi kezelés) 6lgl klónban (180%). Ez a magas expressziós érték egy 60%-kal alacsonyabb kópiaszámú transzgén-beépülés (1,0-6lgl) ellenére érvényesült (1,6-11ggs). A DHAC-indukció a nyár endogén *gshI*-génexpressziós szintjére szignifikánsan hatékonyabb volt a nem-transzformált (X) klónban (19,7-szeres), mint a transzformáns klónokban (6lgl-8,7-szeres; 11ggs-2,5-szeres).

**Kulcsszavak:** qPCR, DHAC, transzgénikus nyár

### SUMMARY

Relative gene expression levels of transgene *gshI* ( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase cloned from *E. coli*) were analyzed by qRT-PCR in two transgenic poplar (*Populus × canescens*) clones (11ggs and 6lgl) and wild type (WT). An extremely high expression level of transgene *gshI* was observed in the 6lgl clone (13.5-fold) compared to 11ggs (1.0) samples, which level was doubled (1.8-fold) in the DHAC (5,6-dihydro-5'-azacytidine hydrochloride) treated (at  $10^{-4}$  M for 7 days) 6lgl samples but not in the 11ggs clone (0.4-fold). Contrary to this result, relative copy number of transgene *gshI* in the 6lgl clone was found to be less 60% less (1.0) than in the 11ggs samples (1.6). Relative expression levels of proper poplar gene *gshI*-poplar showed significantly higher responsiveness to DHAC treatment than transgene *gshI* with the highest expression level in the untransformed (WT) poplar clone (19.7-fold) compared to transformed 6lgl (8.7-fold) and 11ggs (2.5-fold) clones. For internal controls constitutively expressed housekeeping genes *α*-tubulin were applied. For data analysis, the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used. DHAC applied in long-term cultures (27 days) at low concentrations ( $10^{-8}$  –  $10^{-6}$  M) showed morphogenetic activity by initiating de novo root development of leaf discs.

**Keywords:** qRT-PCR, DHAC, transgenic poplar

### BEVEZETÉS

A legstabilabb génkonstrukciók is ki vannak téve a gén-csendesítés (*gene silencing*) hatásának, amely

elsősorban a DNS metilációján keresztül megy végbe a DNS metiltransferáz (CMT) katalízisében (Wolfe és Matzke, 1999). A DNS citozin nukleotidjának metilációja 5-metilcitozinná (5-mC) a növények természetes molekuláris védelmi mechanizmusa (Linn et al., 1990). A CMT-inhibitor kezelésnek kitétt növényekben a metilációs szint csökkenéséről, új metilációs mintázat, valamint elhallgattatott gének reaktivációja megy végbe. Vizsgálatainkban ezért a transzgén reaktivációban hatékonynak bizonyult, DNS metiltransferáz (CMT) enzim gátlásán keresztül ható DHAC (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) (Sheikhnejad et al., 1999) indukciót alkalmaztuk a 11ggs és 6lgl *gshI*-transzgénikus nyárfaklónokban, valamint a nem-transzformáns klónban. A *gshI* gén (és a kapcsolódó gének) aktivitásának mérésére reverz transzkriptációs kvantitatív PCR-t (qRT-PCR) alkalmaztunk. A DHAC-indukált *gshI* gén reaktiváció végső célja egy alternatív molekuláris lehetőség kidolgozása volt a transzgénikus *gshI* nyárfaklónok kiváltására.

A glutation (GSH) első leírása a növényi sejtekből De Rey-Pailhade (1888a, b) kísérleteihez kötődik. Élesztőben és más sejtekben azonosított egy vegyületet, amely spontán reakcióba lépett elemi kénnel hidrogén-szulfidot létrehozva. Az új vegyületet *philotion*-nak nevezte el. 1921-ben Hopkins arra a következtetésre jutott (tévesen), hogy ez a vegyület egy dipeptid, amely ciszteinből és glutaminsavból áll, és valószínűleg  $\gamma$ -glutamil-ciszteintről van szó (Hopkins és Dickinson, 1922). Egy későbbi vizsgálata során 1929-ben mutatta ki az új vegyületben a glicint (Hopkins, 1929), majd 1930-ban írta le a ma ismert szerkezetét, és vezette be a glutation elnevezést, amely az eredeti *filotion* és a peptidet jelző *pepton* végződésre vezetett vissza (Simoni et al., 2002). Ma már ismert, hogy a GSH a legfontosabb és a legnagyobb mennyiségben előforduló tioltartalmú antioxidáns vegyület növényi szövetekben (Bittsánszky, 2006; Gullner et al., 2001; Gullner és Kőmives, 1998).

A glutationnak ez a tulajdonsága hívta életre az antioxidánsokat kódoló génekkel történő transzformációs kutatásokat, amely a hosszú élettartamú fás növényeknél különösen nagy jelentőségű. A glutation anyagcserében történő stabil genetikai módosításokhoz az INRA 717-1-B4 jelű *Populus × canescens* klónok kerültek felhasználásra a szürkenyár fitoextrakciós kapacitása, valamint a szürkenyár előnyös *Agrobacterium tumefaciens*-el szembeni fogékonysága miatt. A transzformációk célja minden esetben a redukált glutation tartalom

növelése volt (Leple et al., 1992; Rennenberg és Peuke, 2005).

*A 1lgs és a 6lgl klón előállítás.* A szürkenyár klónokat az *Escherichia coli* baktériumból származó  $\gamma$ -glutamil-cisztein szintáz ( $\gamma$ -ECS) enzimet kódoló génnel (*gshI*) transzformálták (Leple et al., 1992). Az enzim a glutation tripeptid bioszintézisének egyik fontos lépését, a glutaminsav és cisztein aminosavak peptid-kötés reakcióját katalizálja, amely lépéssel a  $\gamma$ -glutamilcisztein ( $\gamma$ -EC) dipeptid, a glutation prekürzora jön létre.

A *gshI* gén cDNSe klóntárból állt rendelkezésre (Watanabe et al., 1986). A gén eredeti start-kodonját (TTG) előbb az eukariótákra jellemző 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 – *gshI* – 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 (Koncz és Schell, 1986), amellyel a végső transzformációt végezték (*P. ×canescens*) (Leple et al., 1992).

Kétféle *gshI*-génnel transzformált klóntípust állítottak elő. A 1lgs klónban a transzgen fehérjeterméke a citoszolban expresszálódik (Arisi et al., 1997), a 6lgl klónban a CaMV-35S promóter és a *gshI* gén közé beépített borsó RUBISCO gén kis alegységének tranzit peptid génje (borsó *rbcS*) következtében a *gshI* gén terméke beszállítódik a kloroplasztisba (Noctor et al., 1998a). A transzgenikus klónokban a GSH tartalom 2-4-szeresen magasabbnak bizonyult, mint a kontroll klónokban.

Öt transzformáns klónban sikerült az enzimet túltermeltetni (*ggs* típusok), amelyekben a bakteriális  $\gamma$ -ECS a citoszolban termelődött. Az öt vonalból négyben mutatott a transzgen jelentős expressziót. A levélkivonatokban a bakteriális fehérje mennyisége összefüggésben volt a transzgen expressziójával. A transzformáns vonalakban a GS (glutation szintáz) és GR (glutation reduktáz) aktivitás nem mutatott változást a kontroll vonalához képest, viszont 2-4-szer nagyobb GSH tartalom volt mérhető a levelekben. A GSH tartalom növekedése együtt járt a redukált glutation (GSSG) növekedésével. A  $\gamma$ -EC tartalom is 5-15-szeres mértékben nőtt. A szabad aminosavak mennyiségének meghatározása azt mutatta, hogy a levelek glutaminsav- és glicintartalma nincs befolyással a  $\gamma$ -ECS túltermeltetésére (Arisi et al., 1997; Noctor et al., 1998b).

Későbbi munkákban a bakteriális  $\gamma$ -ECS enzimet a kloroplasztisban termeltették túl (*lgl* klónok). Hét független stabil vonalat állítottak elő a több ezer transzformációs kísérletből, amelyekből öt klón különösen nagy  $\gamma$ -ECS aktivitást mutatott, amely

korrelált a western hibridizációban kapott sáv intenzitásokkal. Kloroplasztisz izolálás után végzett mérések megerősítették, hogy a transzgen fehérjeterméke az *lgl* klónokban a kloroplasztisban, a *ggs* klónokban pedig a citoszolban jelenik meg. Az *lgl* klónokban 4-5-ször magasabb enzimaktivitás volt tapasztalható, ami a GR enzimhez hasonlóan a kloroplasztisban való stabilabb állapottal magyarázható. Hasonlóan a *ggs* klónokhoz az *lgl* konstrukciókban is erősen nőtt a tiol tartalom. A  $\gamma$ -EC a levelekben még a *ggs* klónokénál is nagyobb mennyiségben volt jelen (a kontrollhoz képest 50-szeres mennyiségben). Ezek a transzgenikus növények bizonyították, hogy a  $\gamma$ -ECS túltermeltetésével a növényekben megemelhető a GSH tartalom a növény növekedésének károsodása nélkül (Noctor et al., 1998b).

*Korábbi konstrukciók.* A kísérletek kezdeti szakaszában az *E. coli* baktérium GR enzim *gor* génjét építették be, így a transzformáns növények leveleiben a kivonható GR aktivitása 2-10-szer nagyobb értéket mutatott a kontrollhoz képest, de ezerszeresére is növekedett, amikor a tranzit-peptid konstrukciót a kloroplasztisba jutatták. A GR az oxidált glutation diszulfid kötésének redukcióját katalizálja. A különbség azzal volt magyarázható, hogy a bakteriális enzim stabilabb a kloroplasztisban, mint a citoszolban. A kloroplasztisba juttatott glutation reduktáz enzim nagyobb glutationtartalmat eredményezett, ami a citoszolban történő kifejezetésnél nem volt tapasztalható. Azonban, ezek a transzgenikus növények kevésbé bizonyultak érzékenynek a paraquattal előidézett oxidatív stresszben (Foyer et al., 1995).

Egy későbbi munka során a glutation bioszintézis utolsó lépését katalizáló GS enzim *gsh2* génjével transzformálták a nyárfa klónokat. A transzformánsokban az enzim a citoszolban halmozódott föl. A kivonható GS aktivitás egyes klónokban 300-szorosára növekedett a kontrollhoz képest. Az óriási aktivitásnövekedés ellenére a tiol tartalom a levelekben nem változott. A transzformáns levelekből vágott korongok akkor halmoztak fel több glutationt, ha az exogén  $\gamma$ -EC-t adagoltak hozzájuk (Strohm et al., 1995). A GS enzimet a kloroplasztban is túltermeltették. Ezekben a növényekben a kivonható GS aktivitása akár 500-szorosára is megnőtt, viszont a GSH mennyiség ebben a konstrukcióban sem változott szignifikánsan (Noctor et al., 1998a, b).

## ANYAG ÉS MÓDSZER

*Növényanyag.* A *Populus ×canescens* hibridek két *gshI*-transzformáns klónját a 1lgs (Arisi et al., 1997) és a 6lgl (Noctor et al., 1998a) klónokat, valamint a nem transzformáns (*WT*) kontroll klónt (*I. ábra*) alkalmaztuk. A klónokat in vitro hajtástenyészeten tartottuk fenn WPM (Woody Plant Medium) táptalajon (Lloyd és McCown, 1980).

1 ábra: A *gshI* transzgén relatív expressziónövekedése a DHAC-kezelt ( $10^{-4}$  M, 7 nap) transzgenikus szürkenyár klónokban (11ggs, 6lgl) (SD<sub>5%</sub>)

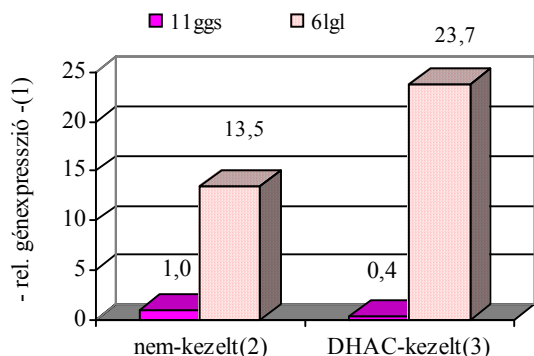


Figure 1: Increase of the relative gene expression levels of *gshI*-transgene in the DHAC-treated samples of poplar (*Populus × canescens*) clones (Standard Deviations were less than 5% of the mean value in each case)

Relative Gene Expression(1), Untreated(2), DHAC-treated(3)

**DHAC-kezelés.** A steril növények leveleiből 9 mm átmérőjű levélkorongokat vágunk (Bittsánszky, 2006; Gyulai et al., 2005), majd DHAC-t (5,6-dihidro-5'-azacitidin hidroklorid) tartalmazó ( $10^{-4}$  M) táptalajra helyeztük (Gyulai et al., 1995, 2005; Gullner et al., 2005), és inkubáltuk 7 napig, 16/8 világos/sötét ( $40 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ) megvilágítás mellett (Bittsánszky et al., 2005b).

**RNS izolálás.** Totál RNS-t 0,05 g tömegű levélkorongokból izoláltunk (Gyulai et al., 2005; Bittsánszky et al., 2005a, 2006). Az RNS izolálást Absolutely RNA Miniprep Kit-tel (# 400800,

Stratagene, USA – Biomedica, Hungary) végeztük. A kivont RNS minták minőségét és mennyiségét ( $2 \mu\text{l}$  RNS) NanoDrop ND-1000 UV-Vis spektrofotométer (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA – BioScience, Budapest, Hungary) segítségével állapítottuk meg.

**cDNS szintézis.** Az egyszálú cDNS-t a mRNS templáton reverz transzkripcióban oligo(dT)18 primer alkalmazásával végeztük (Fermentas – Biocenter (Szeged, Hungary; # K1622) a gyártó eljárását követve

**qPCR elemzés.** A transzgén-*gshI* (*E.coli*), nyár-*gshI* (*Populus × canescens*) gének expressziós szintjét qPCR elemzéséhez DyNAmo HS SybrGreen I qPCR Kit-et (F-410L, Finnzymes, Finnország – Izinta, Hungary) alkalmaztunk. A reverz transzkripció (RT) a kvantitatív polimeráz láncreakcióval (qPCR) kombinálva a legérzékenyebb módszere mind az abszolút, mind a relatív génextpresszió kvantifikálásának (Bittsánszky et al., 2006). A SybrGreen fluoreszcens festék a kétszálú DNS (dsDNA) kis árkaiba interkalálódik, ezzel téve lehetővé a PCR termék ciklusonkénti amplifikációjának nyomon követését. A cDNS ( $2,5 \mu\text{l}$ ) minták génextpressziós analíziséhez gén specifikus primereket terveztünk a „Primer3” számítógépes program segítségével (1. táblázat). A reakciókat MX3000P qPCR (Stratagene, USA – Biomedica, Hungary) készüléken végeztük, a termékek felszaporodásának és disszociációjának (olvadáspont vizsgálat) elemzésével. A reakciók kvantifikálásához a cDNS mintából tízszeres hígítási sorozatot ( $1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) készítettünk, és NTC-t (nem DNS templát kontroll) alkalmaztunk. Belső kontrollnak a konstitutívan expresszáldó  $\alpha$ -tubulin gént alkalmaztuk.

1. táblázat

Az alkalmazott primer párok szekvencia adatai

Gén(1)	Primer párok (5'-3')(2)	PCR termék (bp)(3)	Tm (°C)(4)
Nyár- <i>gshI</i> (5)	5'-AGTTCCGAGGCTGACATGAT-3' 5'-CAGCACGGTTGTGTGTCAGTA-3'	160	60 60
Transzgén- <i>gshI</i> (6)	5'-AGGTCAGGACATCGAACTGG-3' 5'-GATGCACCAAACAGATAAGG-3'	272	60 60
$\alpha$ -tubulin(7)	5'-TAACCGCCTTGTTCAGG-3' 5'-CCTGGGGTATGGAACCAAGT-3'	112	60 60

Table 1: Sequence data of primer pairs applied

Gene(1), Primer pairs(2), PCR product(3), Tm(°C)(4), *gshI*-poplar(5), *gshI* transgene(6),  $\alpha$ -tubulin(7)

**Kiértékelés.** A relatív kvantifikálás adatelemzéséhez a  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  módszert (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmaztuk. A Ct küszöbértéket (threshold cycle) manuálisan határoztuk meg. Minden cDNS reakció  $\Delta\text{Ct}$  értékeit a ( $\text{Ct}_{\text{nyár-gshI}} - \text{Ct}_{\alpha\text{-tubulin}}$ ;  $\text{Ct}_{\text{transzgén-gshI}} - \text{Ct}_{\alpha\text{-tubulin}}$ ) képletek alapján normalizáltuk, majd a  $\Delta\text{Ct}$  értékek átlagait

(átl.  $\Delta\text{Ct}_{\text{gén}}$ ) határoztuk meg.  $\Delta\Delta\text{Ct}$  értékek meghatározása során a kezelt minták (átl.  $\Delta\text{Ct}_{\text{gén-kezelt}}$ ) értékeit a kezeletlen kontrollhoz (átl.  $\Delta\text{Ct}_{\text{gén-kezeletlen}}$ ) hasonlítottuk a következő képlet alapján: (átl.  $\Delta\text{Ct}_{\text{gén-kezelt}} - \text{átl. } \Delta\text{Ct}_{\text{gén-kezeletlen}}$ ). Az adatok abszolút értékévé történő alakítása  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  képlettel történt (Livak és Schmittgen, 2001).

**EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁS**

**QRT-PCR eredmények.** A demetiláció hatására nem csak a *gshI*-transzgén, hanem a glutation metabolizmusban résztvevő nyárfa saját (endogén), stressz-induktív promóterekkel hajtott, nem konstitutívan expresszáldó *gshI* gén expressziónövekedése is megemelkedett (2., 3. ábra). Ebben a folyamatban központi szerepet játszott a megnövekedett *gshI*-transzgén aktivitás, amely túltermelte a glutationt (Gullner és Kőmíves, 1998; Kőmíves et al., 1998; Gullner et al., 2001).

A transzgén-*gshI* relatív expressziós szintje a *6lgI* klónokban 13,5-szor nagyobb volt, mint a *11ggs* klónbank (1,0) expressziós szintjénél a kezeletlen növényekben (2. ábra). Ez a különbség a demetiláció hatására megkészszerződött a *6lgI* klónban (23,7), míg a *11ggs* klónban csökkent (0,4). Ez a magas expressziós érték egy 60%-kal alacsonyabb kópiaszámú transzgén-beépülés (1,0-*6lgI*) ellenére érvényesült (1,6-*11ggs*) (2. táblázat).

2. ábra: A nyár-*gshI* gén relatív expresszió növekedése a DHAC-kezelt ( $10^{-4}$  M, 7 nap) transzgenikus (*11ggs*, *6lgI*) és a nem transzformált (WT) szürkenyár klónokban (SD<sub>5%</sub>)

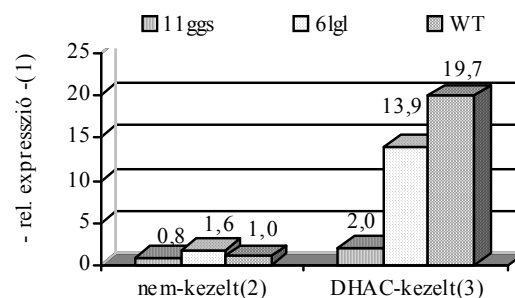


Figure 2: Increase of the relative gene expression levels of poplar-*gshI* gene in DHAC-treated samples of poplar (*Populus×canescens*) clones (transgenic *11ggs* and *6lgI*; and WT) (Standard Deviations were less than 5% of the mean value in each case)

Relative Gene Expression(1), Untreated(2), DHAC-treated(3)

2. táblázat

A *gshI* transzgén (*E. coli*) relatív kópiaszáma a transzformált szürkenyár (*Populus×canescens*) klónokban: **11ggs (A)** és **6lgI (B)** (három minta kétszeres ismétlésben)

Klónok(1)	<i>gshI</i>		<i>α-tubulin</i>		ΔCt		ΔΔCt		kópia # ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )(2)		
	Ct	SD	Ct	SD	érték(3)	SD	érték(3)	SD	érték(3)	-/+	érték(3)
11ggs/1	22,71		23,02		-0,31						
11ggs/1	22,82		23,11		-0,29						
11ggs/1	22,59		22,89		-0,3						
11ggs/2	22,33		22,88		-0,55						
11ggs/2	22,44		22,88		-0,44						
11ggs/2	22,11		22,70		-0,59						
átlag(4)	22,50	0,26	22,91	0,14	-0,41	0,13	-0,75	0,13	<b>1,69</b>	1,54	1,85

Klónok(1)	<i>gshI</i>		<i>actin</i>		ΔCt		ΔΔCt		kópia # ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )(2)		
	Ct	SD	Ct	SD	érték(3)	SD	érték(3)	SD	érték(3)	-/+	érték(3)
6lgI/1	23,9		23,76		0,14						
6lgI/1	23,68		23,28		0,4						
6lgI/1	23,66		23,07		0,59						
6lgI/2	23,86		23,55		0,31						
6lgI/2	23,86		23,32		0,54						
6lgI/2	23,56		23,49		0,07						
átlag(4)	23,75	0,14	23,41	0,24	0,34	0,21	0	0,21	<b>1</b>	0,86	1,16

Table 2: Relative copy numbers of transgene *gshI* (*E. coli*) in the transgenic poplar (*Populus×canescens*) clones *11ggs* (A) and *6lgI* (B) (three repetitions of two samples in each case)

Clones(1), Copy numbers(2), +/- range(3), Mean(4)

Az identikus nyár-*gshI* (3., 4. ábra) gén relatív expressziós szintje is igen nagymértékű emelkedést mutatott a demetilációs kezelések hatására (19,7-szeres expresszió növekedés). A *11ggs* klónban nyár-*gshI* gén preferencia hatását tapasztaltuk a

2,0-szeres relatív expresszió növekedéssel, szemben a *gshI*-transzgén reaktiváció 0,4-szeres értékével. A *6lgI* klónban a *gshI*-transzgén mutatott magasabb demetilációs induktivitást (23,7), mint a saját nyár-*gshI* (13,9).

3 ábra: Kompetitív génexpresszió. A *gshI*-transzgén, valamint a *gshI*-nyárfagén relatív expresszió növekedése a DNS-indukált demetiláció hatására (DHAC;  $10^{-4}$  M, 7 nap) a nem-transzformált (WT – vad típus) és a *gshI*-transzformált szürkenyár klónokban (11ggs, 6lgl) ( $SD_{5\%}$ )

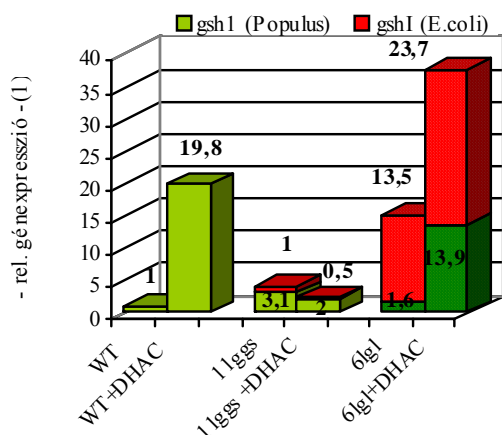


Figure 3: Competitive gene expressions of *gshI*-transgene and a *gshI*-poplar gene in the DHAC-treated ( $10^{-4}$  M, 7 days) samples of poplar (*Populus × canescens*) clones (transgenic 11ggs, 6lgl; and WT) (Standard Deviations were less than 5% of the mean value in each case)

Relative Gene Expression(1)

Eredményeink igazolják, hogy a DHAC-indukált demetiláción keresztüli transzgén-reaktivációval növelhető a stresszgének expressziója.

Annak köszönhetően, hogy a DNS metilációs mintázata öröklődik („epigenetikus memória”), a DHAC-kezelt nyárfá új forrása lehet a növények

szerzett molekuláris védelmi mechanizmusainak tanulmányozására.

A 6lgl klónok *gshI* és *gshI* génexpressziójának összehasonlítása alapján igazolható, hogy a *gshI*-nyárfá gén szignifikánsabb mértékben volt reaktiválhatóbb (1,6-ról 13,9-re, amely 8,7-szoros növekedés), mint a transzgén, amely magas expressziós szintje csak 1,8-szorosára (23,7) nőtt meg. A *gshI*-transzgén és a *gshI*-nyárfagén kompetícióját igazolja, hogy a *gshI*-nyárfagének a nem-transzformált (WT) klónban mért DHAC-indukált génexpresszió-növekedését (1,0-ról 19,7-re, 19,7-szeres relatív expresszió növekedés), sem a 11ggs (0,8-ról 2,0-re, 2,5-szörös expresszió növekedés), sem a 6lgl (1,6-ról 13,9-re, 8,7-szeres expresszió növekedés) nem múlta felül. Mindezek mellett, a DHAC-nem-kezelt *gshI*-transzformált 6lgl klón igen magas transzgén-*gshI* expressziós szintje (13,5-ször magasabb a 11ggs klónban mért értéknél) igazolja a 6lgl klón hatékonyabb fitormediációs kapacitását, amelyet *in vitro* nehézfém felvételi eredmények is alátámasztanak (Gyulai et al., 2005).

**Morfogenetikai hatás.** A hosszú idejű (28 nap) DHAC kezelés egy szignifikáns morfogenetikai hatást eredményezett mindhárom klónban, a  $10^{-8}$  M –  $10^{-7}$  M –  $10^{-6}$  M tartományokban, de novo járulékos gyökérfejlődés indukciójával (4. ábra).

### KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerző köszönetet mond Dr. Bittsánszky A., Dr. Gullner G., Dr. Kiss J., Prof. Kőmíves T., Prof. Heszy L. közreműködéséért.

4. ábra: A DHAC ( $10^{-8}$  M –  $10^{-5}$  M) morfogenetikai hatása: járulékos gyökérindukció a transzgenikus (11ggs, 6lgl) és a nem-transzformált (WT) szürkenyár (*Populus × canescens*) klónokban

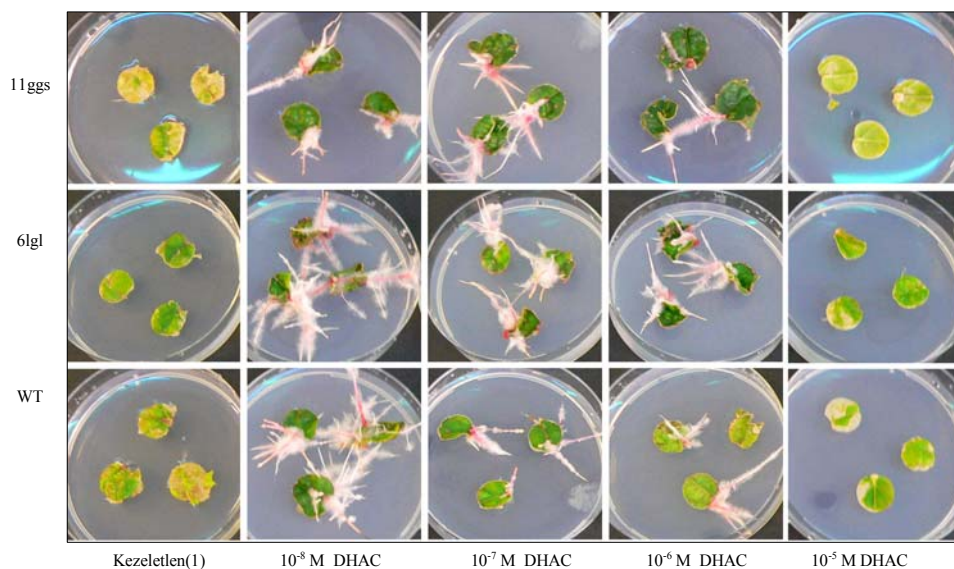


Figure 4: Root initiation capacity of DHAC ( $10^{-8}$  M –  $10^{-5}$  M) on leaf discs of untransformed (WT) and *gshI*-transformed clones (11ggs, 6lgl) of hybrid poplar (*P. × canescens*) incubated in long-term cultures (28 days)

Untreated(1)



## IRODALOM

- Arisi, A. C. M.-Noctor, G.-Foyer, C. H.-Jouanin, L. (1997): Modification of thiol contents in poplars (*Populus tremula* × *P. alba*) overexpressing enzymes involved in glutathione synthesis. *Planta* 203:362-372.
- Bevan, M. (1984): Binary Agrobacterium Vectors For Plant Transformation. *Nucleic Acids Research* 12:8711-8721.
- Bittsánszky A. (2006): A *gsh1*-transzgénikus szűrkenyár stresszindukciója Zn<sup>2+</sup> és paraquat tesztben; feketenyár sejtklónok SSR diverzitása. PhD Disszertáció, Gödöllő.
- Bittsánszky, A.-Gyulai, G.-Gullner, G.-Kiss, J.-Csintalan, Zs.-Szabó, Z.-Lágler, R.-Kömíves, T. (2005a): Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus*). *Hung Agric Research* 2005/1:13-15.
- Bittsánszky, A.-Kömíves, T.-Gullner, G.-Gyulai, G.-Kiss, J.-Heszky, L.-Radímszky, L.-Rennenberg, H. (2005b): Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate Zinc (2+) stress. *Environment International* 31:251-254.
- Bittsánszky, A.-Gyulai, G.-Humphreys, M.-Gullner, G.-Csintalan, Zs.-Kiss, J.-Szabó, Z.-Lágler, R.-Tóth, Z.-Rennenberg, H.-Heszky, L.-Kömíves, T. (2006): RT-PCR analysis and stress response capacity of transgenic *gsh1*-poplar clones (*Populus* × *canescens*) in response to paraquat exposure. *Z. Naturforschung* 61c:699-730.
- De Rey-Pailhade, J. (1888a): Sur un corps d'origine organique hydrogenant le soufre a froid. (On a body of organic origin hydrogenated cold sulfur.) *Compte Rendus Hebdomadaire Séances de l'Académie des Sciences* 1888;106:1683-4 (in French).
- De Rey-Pailhade, J. (1888b): Nouvelles recherches physiologiques sur la substance organique hydrogenant le soufre a froid. (New physiological research on an organic substance cold sulfur.) *Compte Rendus Hebdomadaire Séances de l'Académie des Sciences* 1888; 107:43-4 (in French).
- Foyer, C. H.-Sourian, N.-Perret, S.-Lelendais, M.-Kunert, K. J.-Provost, C.-Joianin, L. (1995): Overexpression of glutathione-reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology* 109:1047-1057.
- Gullner G.-Kömíves T. (1998): A glutation szerepe növény-kórokozó kölcsönhatásokban. *Biokémia* 22:83-88.
- Gullner, G.-Kömíves, T.-Rennenberg, H. (2001): Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *J. Exp. Botany* 52:971-979.
- 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* 45:39-44.
- Gyulai, G.-Jekkel, Z.-Kiss, E.-Kiss, J.-Heszky, L. (1995): A selective auxin and cytokinin bioassay based on root and shoot formation in vitro. *J Plant Physiol* 145:379-382.
- Gyulai, G.-Humphreys, M.-Bittsánszky, A.-Sköt, K.-Kiss, J.-Sköt, L.-Gullner, G.-Heywood, S.-Szabó, Z.-Lovatt, A.-Radímszky, L.-Roderick, H.-Abberton, M.-Rennenberg, H.-Kömíves, T.-Heszky, L. (2005): AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic *gsh1*-poplar clones (*Populus canescens* L.) in vitro. *Z. Naturforschung* 60c:300-306.
- Hopkins, F. G. (1929): On glutathione: A reinvestigation *J. Biol. Chem.* 84:269-320.
- Hopkins, F. G.-Dickinson, M. (1922): On Glutathione. II. A thermostable oxidation-reduction system *J. Biol. Chem.* 54 (3):527-563.
- Koncz, C.-Schell, J. (1986): The promoter of T1-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* 204:383-396.
- Kömíves, T.-Gullner, G.-Király, Z. (1998): Role of glutathione and glutathione-related enzymes in response of plants to environmental stress. *Stress of life. From molecules to man* 851:251-258.
- Lepel, J. C.-Brasileiro, A. C. M.-Michel, M. F.-Delmotte, F.-Jouanin, L. (1992): Transgenic poplars-expression of chimeric genes using 4 different constructs. *Plant Cell Reports* 11:137-141.
- Linn, F.-Heidmann, I.-Saedler, H.-Meyer, P. (1990): Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation. *Molecular and General Genetics* 222:329-336.
- Livak, K. J.-Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. *Methods* 25:402-408.
- Lloyd, G.-McCown, B. H. (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Com. Proc Int Plant Prop Soc* 30:421-427.
- Noctor, G.-Arisi, A. C. M.-Jouanin, L.-Foyer, C. H. (1998a): Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiology* 118:471-482.
- Noctor, G.-Arisi, A. C. M.-Jouanin, L.-Kunert, K. J.-Rennenberg, H.-Foyer, C. H. (1998b): Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Botany* 49:623-647.
- Rennenberg, H.-Peuke, A. D. (2005): Phytoremediation with transgenic trees. *Z. Naturforschung* C60:199-207.
- Sheikhnejad, G.-Brank, A.-Christman, J. K.-Goddard, A.-Alvarez, E.-Ford, Jr. H.-Marquez, V. E.-Marasco, C. J.-Sufirin, J. R.-O'Gara, M.-Cheng, X. (1999): Mechanism of inhibition of DNA (cytosine C5)-methyltransferases by oligodeoxyribonucleotides containing 5,6-dihydro-5-azacytosine. *Mol. Biol.* 285:2021-2034.
- Simoni, R. D.-Hill, R. L.-Vaughan, M. (2002): The Discovery of Glutathione by F. Gowland Hopkins and the Beginning of Biochemistry at Cambridge University *J. Biol. Chem.* 277:27-28.
- Strohm, M.-Jouanin, L.-Kunert, K. J.-Provost, C.-Polle, A.-Foyer, C. H.-Rennenberg, H. (1995): Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula* × *Populus alba*) overexpressing glutathione synthetase. *Plant Journal* 7:141-145.
- Watanabe, K.-Yamamoto, Y.-Murata, K.-Kimura, A. (1986): The nucleotide-sequence of the gene for gamma-glutamylcysteine synthetase of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 14:4393-4400.
- Wolfe, A. P.-Matzke, M. A. (1999): Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286:481.
- Fermentas Life Science (2007): RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit.