
*A búza
fagyállóságban
szerepet játszó
Cbf gének
szerepének
bizonyítása
transzformációval*

OTKA K75528 - ZÁRÓJELENTÉS

Vágújfalvi Attila – vezető kutató

Tartalom

A pályázat célja.....	2
Az elvégzett munka	3
Gabonafélék transzformációja	3
Fagyállóság tesztelése	3
Fagytesztek.....	3
Génexpressziós vizsgálatok.....	8
A transzgénikus vonalak metabolomikai analízise	9
Géncsendesítés	10
Egyéb abiotikus stressz-tolerancia tesztek.....	12
Ozmotikus stressz-tolerancia teszt	12
Fiatalkori szárazság-stressz	13
Fejlett növénykori szárazság-stressz	13
Komplex stressz-tűrési vigor teszt (CSV, Complex Stressing Vigour Test).....	13
Transzgénikus anomália: eltérő fejlődési ütem, kalászolási idő	13
Specifikus anyag előállítása további vizsgálatokhoz.....	14
Transzgénikus Arabidopsis vonalak létrehozása, fenotípusos analízise.....	15
Összefoglalás:	18
Együttműködések, dolgozatok a pályázat kapcsán:	18

A pályázat célja

Kutatócsoportunk tevékenyen járult hozzá annak a bizonyításához, hogy fagyállóság kialakulásában - a modellnövényhez, az Arabidopsishez hasonlóan – a gabonafélékben is kiemelkedő szerepük van a *CBF* géneknek. Két független kísérleti rendszerben, két búzafajon végzett kísérletekkel azonosítottuk azokat a jelölt *CBF* géneket, a melyek a fagyállóság genetikai kontrolljában ténylegesen szerepet játszanak. Kenyérbúzában génexpressziós kísérletek a *CBF14*, a *CBF15* és a *CBF16* géneket, míg alkalorban végzett térképezési munkák a *CBF12*, *CBF14* és a *CBF15* géneket azonosították. A kapott eredmények között tehát két *CBF* gén azonosnak bizonyult: mindkét rendszer a *CBF14* és a *CBF15* géneknek a fagyállóság kialakításában játszott szerepét igazolta.

A pályázatban azt vállaltuk, hogy e gének szerepét direkt módon, transzformációval, mind a gének túltermeltetésével, mind azok elcsendesítésével bizonyítjuk. Ehhez transz(cisz)génikus árpa, búza és Arabidopsis vonalakat állítunk elő, és azok analízisével igazoljuk hipotézisünket.

Az elvégzett munka

Gabonafélék transzformációja

Kezdeti lépésként pAHC25 vektorba építettük a *CBF14*, *CBF15* és *CBF16* géneket; egyrészt a konstitutív ubikvitin promóterrel, másrészt a búzából izolált hideg-indukálható *Wcs120* promóterrel készítettük el a vektorokat. A konstrukciókat PCR-rel verifikáltuk. A konstitutív *CBF* expressziót biztosító konstrukciókkal a transzformációt biolisztikus módszerrel végeztük el kallusz-tenyészetben, melyet a CY-45 tavaszi kenyérbúza éretlen kalászaiból indítottunk. A transzformáció során 150 Petricsészényi anyagot lőttünk be. A kalluszokból növényt regeneráltunk, és a regenerálódott növényeket PPT-tartalmú táptalajon szelektáltuk. A transzformáció sikerességét mindkét növényfaj esetében PCR reakcióval vizsgáltuk. Sajnos nem találtunk transzgenikus növényt. Megpróbálkoztunk búza-zigóta mikro-injektálásával is. Siete Cerros genotípus próbáltunk meg transzformálni mikro-injektálás módszerével (Jäger Katalin közreműködésével, MTA ATK MGI, Növényi Sejtbiológiai Osztály). Harminc Ta*CBF14*-transzformáns jelölt búza növény regenerálódott, de egyikük sem bizonyult PCR pozitívnak.

Mivel a biolisztikus transzformációnál hatékonyabb módszer az agrobaktériummal történő transzformáció, a *CBF14* és *CBF15* *CBF* géneket egy Gateway-kompatibilis bináris vektorba (pBract214) építettük, a konstitutív expressziót biztosító ubikvitin promótert használva. Egy COST pályázat keretében (Dr. Wendy Harwood laboratóriuma, John Innes Centre, Norwich, UK) lehetőségünk nyílt az árpa agrobaktériummal történő transzformációjának elsajátítására: a konstrukciókkal a tavaszi Golden Promise árpát transzformáltuk. 10 független *CBF14*, és 18, a *CBF15* génnel transzformált vonal áll rendelkezésünkre. Tekintettel arra, hogy Martonvásáron a búza génbelövéses kísérleteink nem jártak sikerrel, ezért egy angliai kutatócsoporttal (Huw D Jones, Rothamsted Research, UK) együttműködve végeztük el a *CBF14* és *CBF15* *CBF* gének biolisztikus transzformációját. E kooperáció eredményeként a transzformáns kontrol mellett 12 *CBF14* és 11 *CBF15* független transzformációs vonalat állítottunk elő. Real Time PCR-rel meghatároztuk az egyes független transzformáns vonalakban a transzgen kópiaszámát, mely az árpa esetében - a transzformáció módszeréből adódóan - legtöbb esetben egynek bizonyult, míg árpa esetében - a génbelövéses módszer miatt - 1 és 12 kópia között variált. Későbbiek során néhány esetben a génkópiaszámot az adott vonalak utódainak szegregációs adatai alapján korrigáltuk. Búza esetében az utódgeneráció génkópia számának szegregációs analízisével igazoltuk, hogy a gének egy helyre épültek be, azaz a gének egy kapcsoltsági csoportként öröklődnek. A transz(cisz)genikus vonalakban gDNS-en végzett PCR-rel igazoltuk a konstrukciók mindene egyes elemének (promóter, transz(cisz)gén, terminátor) intaktságát, és RT-PCR-rel bizonyítottuk a transzgen működését, expresszióját.

Fagyállóság tesztelése

Fagytesztek

A *CBF* gének fagyállóságban betöltött szerepét elsősorban fagytesztekkel bizonyítjuk. Mivel a transzformációhoz alkalmazott konstrukciók a transz-(cisz-)gén folyamatos megnyilvánulását biztosítják, ezért, feltételezésünk szerint, a transz(cisz)genikus növények

fagyállósága abban az esetben is jobbnak bizonyulhat, ha a növények nem kapnak (a természetes körülményeket modellezendő, a fagyteszteket megelőzően rutinszerűen alkalmazott) hidegedzést, hiszen a beépített *CBF* transzkripció faktor folyamatos működése – részben- kiváltja ezt a fiziológiás periódust. Azonban mind a búza, mind az árpa vonalakkal végrehajtottunk olyan fagytesztet is, melynek során hideg-edzési periódust is alkalmaztunk.

Mivel mind árpa, mind búza esetében viszonylag nagyszámú transzgenikus vonal állt a rendelkezésünkre mindkét transzgen (*CBF14* és *CBF15*) esetében, ezért szűrő kísérletekben igyekeztünk kiválogatni azokat a vonalakat, amelyekben a fagyállóság megnőtt a transzgen hatására, illetve ezek közül is igyekeztünk a legjobb vonalakat azonosítani; majd az így azonosított vonalakat aztán részletesebb teszteknek kitenni. Tettük ezt azért, mert célunk nem a minél több transzgenikus vonal előállítása volt, hanem az adott gének funkciójának bizonyítása. A funkció bizonyítását megpróbáltuk (és jelenleg is próbáljuk) több oldalról megközelíteni, ez azonban csak kezelhető, korlátozott számú transzgenikus vonal analízisével lehetséges a rendelkezésünkre állt/álló keretek között. Ilyen megfontolásból a búza és árpa növényeket egy hideg-edzési periódusos és a nélkül kivitelezett elő-kísérletben különböző hőmérsékleteken fagyasztottuk, majd az ily módon szelektált vonalakkal egy újabb fagyteszteket hajtottunk végre.

Árpa fagyteszteket edzéssel -12°C , -11°C , és -13°C -on, míg edzés nélkül -4°C és -6°C -on hajtottunk végre. A búza vonalakat edzéssel -10°C , -11°C , -12°C és -13°C -on, edzés nélkül pedig -5°C , -6°C és -7°C -on teszteltük.

Azért, hogy ne csak szegregáló populációkat vizsgáljunk, az eredmények még egyöntetűbbek legyenek, az alacsony kópia számú transzgenikus árpa vonalokban Real Time PCR alapú módszerrel, a gén-kópiaszám alapján azonosítottuk a homozigóta T1 egyedeket, majd az ily módon azonosított vonalakat T1 homozigóta egyedeiből kiindulva T2 homozigóta populációt állítottunk elő és vetettünk alá fagyteszteknek.

A fagyteszteket minden esetben többféle módon értékeltük. A növények II. fotokémiai rendszerének (PSII) fagyás által okozott működésbeli változását a PSII maximális kvantumhatásfokának meghatározásával állapítottuk meg, mely a sötétadaptált növény levelén mért változó (F_v) és maximális (F_m) fluoreszcencia aránya (F_v/F_m). A másik indirekt módszerrel a fagy hatására a levélsejtekből kiáramló elektrolitok mennyiségét mértük konduktometriával. A növények fagykárosodását a regenerálódó-képességük alapján is meghatároztuk. A növények túlélésének mértékét a fagyasztás után egy, ill. két héttel értékeltük egy 0-tól (a fagyasztást nem élte túl) 5-ig (a fagyasztást károsodás nélkül túlélő) terjedő skálán. A túlélési százalékot adott vonalra a fagyasztást túlélő / fagytesztnek kitétt növények arányában számoltuk ki.

Jelen összefoglalóban nincs mód arra, hogy az összes eredményt bemutassuk. Ehelyett néhány reprezentatív eredményt ismertetünk. Az árpában kapott két kísérlet eredményeink egyfajta összegzése az 1. táblázat, amelyben két fagyteszt különböző értékelési szempontjaiból kapott eredményeit foglaltuk össze.

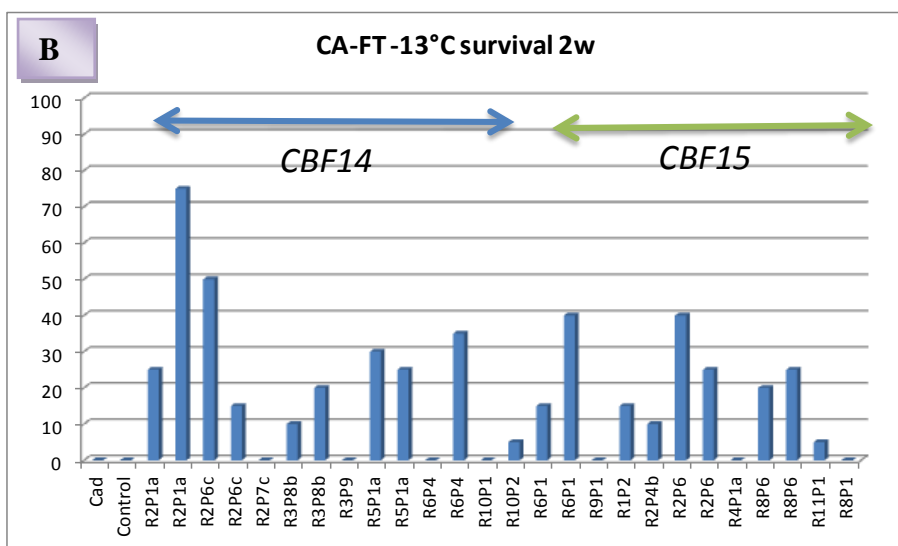
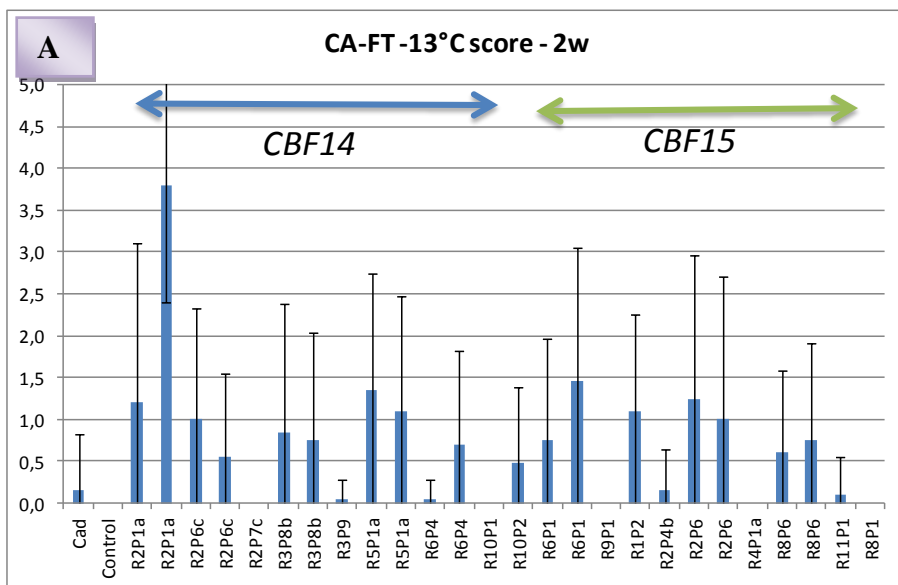
Lines		1 st FT								2 nd FT					Σ^*	Survival %				
		F _v /F _m				Rate of recovery				F _v /F _m		cond				Rate of recovery		1 st FT	2 nd FT	
		24 h		48 h		1 week		2 weeks		24 h	48 h	24 h	1 week	2 weeks		1 week	2 weeks	-11°C	-13°C	-13°C
		-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-11°C	-13°C	-13°C	-13°C	-13°C	-13°C	-13°C		-13°C	-13°C	-11°C	-13°C	-13°C
4A/1/1	CBF14		**		**	***	***	*	***	*	***	*			19	27,8	31,6	16,7		
4-5-6/1/1	CBF14					*	**	*	*	*	*	*			5	12,5	10			
5/1/1	CBF14									**	***				5					
6A/1/2	CBF14	***			***	***	**	**	*	***	***	***	**	**	27	36,8	15	50		
6B/1/1	CBF14					**	**	**	**			**			6	11,8	18,8			
21B/1/1	CBF14			***	***	***	***	**	*			*			14	45	22,2	33,3		
23A/1/2	CBF14				**	***	***	*	*			***		*	10	5,56	10,5	30		
23A/2/1	CBF14				*	*	*	*	**	***	**	*	*	*	10	16,7	15,8	37,5		
23B/1/1	CBF14				**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3	7,69				
24/1/1	CBF14	*			***	***	***	***	***			**		***	21	55,6	25	70		
9A/1/1	CBF15					**	*	*	**			*	*	*	7	nd	11,8	50		
9A/2/1	CBF15																	10		
9B/1/2	CBF15																			
12A/1/3	CBF15				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	1	5,88				
12B/1/1	CBF15															5,56				
12B/2/1	CBF15				***	***	***	**	*						5	35,7		10		
12C/1/1	CBF15																			
12-18/1/1	CBF15				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	3	20				
12-18/2/1	CBF15															9,09	5	20		
12-18/3/2	CBF15																			
12-18/4/1	CBF15										**				2			20		
17/1/1	CBF15									*	*	*	*	*	2	7,69				
17/2/1	CBF15																			
17/3/1	CBF15									**	**	**	**	**	4			20		
17/4/1	CBF15																	10		
18/1/1	CBF15												*	*	1	9,09		20		
19/1/2	CBF15																			
19/2/1	CBF15																			

1. táblázat

Árpa fagytesztek különböző paraméterek (F_v/F_m paraméter, konduktancia/cond/, regeneráció és túlélés) alapján megállapított eredményeinek táblázatos bemutatása.

A könnyebb áttekinthetőség kedvéért (a túlélési adatokat kivéve) csak szignifikancia szinteket jelöltünk (*, **, *** szignifikáns eltérés a transzformáns kontrolltól P ≤ 0.05, 0.01 és 0.001 szinten).

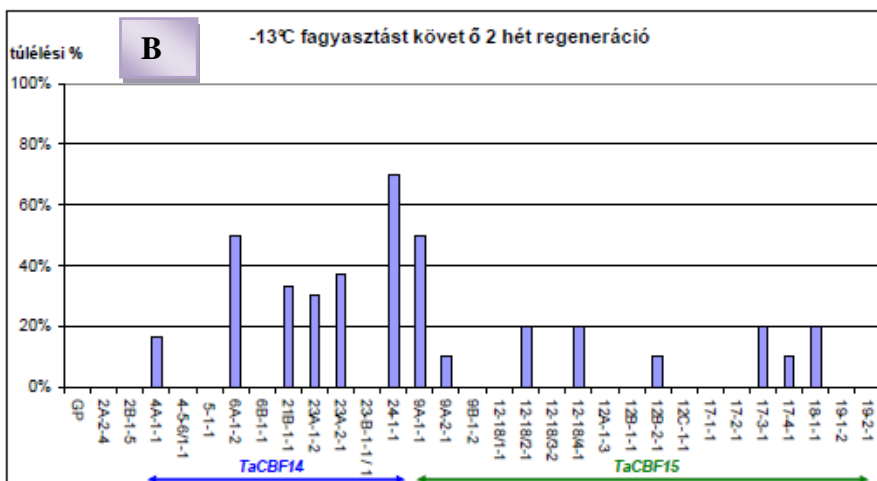
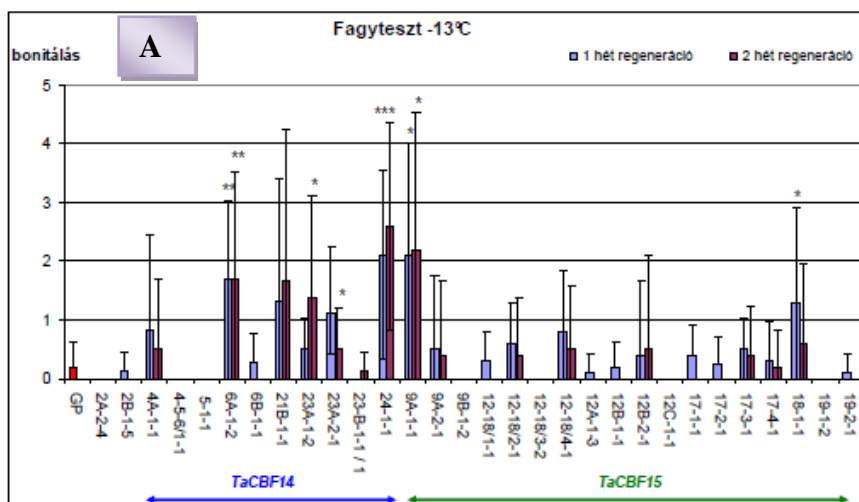
A fagytesztekkel kapott eredményeink egyértelműen igazolták, hogy mind a CBF14, mind a CBF15 transzgenikus vonalak között jó néhány olyan állítottunk elő amely ezen paraméterek alapján fagyállóbbnak bizonyult, mint a nem- transzformáns Golden Promise árpa, illetve nem- transzformáns Cadenza búza. Az 1. ábra A panelje a hideg-edzés után -13°C-on végrehajtott fagytesztek bonitálási eredményét mutatja búza ciszgenikus, míg a 2. ábra A panelje transzgenikus árpavonalakon. Az eredmények még szembeötlőbbek, ha a túlélési százalékokat tekintjük (1. és 2. ábra B paneljei): jó néhány olyan búza és árpa vonalat azonosítottunk, mely túlélte (néhány vonal ugyancsak túlélte, mivel a túlélés 60-70%!) azt a -13°-os hőmérsékletet, mely a nem-transzgenikus búza illetve árpa recipiens (Cadenza ill., Golden Promise) számára abszolút letális volt (3. ábra).



1. ábra

A panel: a -13°C-on végzett búza fagyteszt bonitálási értékeinek ábrázolása két hét regeneráció után.

B panel: A -13°C-on végzett búza fagyteszt után két héttel felvételezett túlélési % adatok.



2. ábra

A panel: a -13°C-on végzett árpa fagyteszt bonitálási értékeinek ábrázolása 1 illetve 2 hét regeneráció után. A vad típusú Golden Promise-től (GP) való szignifikáns eltérés jelölése: * ; ** ; ***, ha $P < 0,05$; $0,01$; $0,001$.

B panel: A -13°C-on végzett árpa fagyteszt után két héttel felvételezett túlélési % adatok ábrázolása.



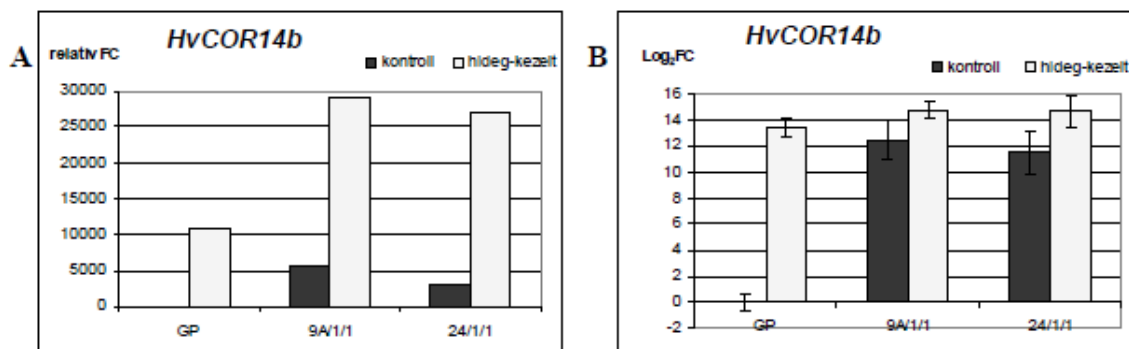
3. ábra

A fagytesztet túlélő CBF-ciszgénikus búza vonalak 2 hét regeneráció után

Génexpressziós vizsgálatok

A transzgénikus vonalakban tanulmányoztuk a transzkripció faktorát kódoló transzgén és néhány, az általuk szabályozott (downstream) néhány hideg-indukálható gén, majd néhány gibberellinsav-oxidáz gén, valamint az árpa, illetve búza néhány, saját, endogén CBF génjének expresszióját is. A vizsgálatunkat szemi-quantitatív, és Real Time RT-PCR-rel végeztük.

A CBF gének által vezérelt, a LEA proteinek csoportjába tartozó négy gén (*HvCOR14b*, *HvA22*, *HvDHN5*, *HvDHN8*) expresszióját tanulmányoztuk. Ezek azért informatív gének, mert bizonyították a szerepüket a gabonafélék hidegedződésében és a fagyállóságuk kialakításában. Igazoltuk, hogy a konstitutívan expresszázó CBF transzgén befolyásolja a vizsgált gének működését. A legerőteljesebb hatást a transzgénikus árpa vonalak analízisekor a *HvCOR14b* gén esetén tapasztaltuk. A *HvCOR14b* egy alacsony hőmérsékleti stressz hatására expresszázó gén. A *TaCBF14* és *TaCBF15* transzgén már kontroll körülmények között is indukálta, és az közel olyan magas szinten expresszált, mint a vad típusban alacsony hőmérsékleti kezelés hatására (4. ábra).



4. ábra

A *HvCOR14b* gén expressziós vizsgálata Real-Time RT-PCR-rel. (A: relatív Fold Change, B: Log₂FC érték). A vad típusú GP (Golden Promise) kontroll mintáit tekintettük összehasonlítási alapnak.

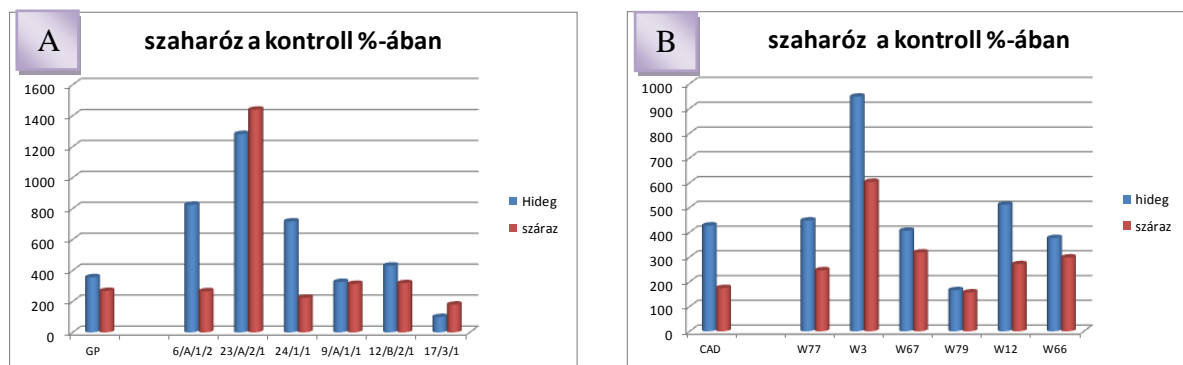
A másik három tanulmányozott LEA proteint kódoló gén expressziós vizsgálata során néhányszor nagyobb génextpressziót detektáltunk a transzgenikus vonalakban - elsősorban a fagytesztek alapján legellenállóbb vonalban -, mint a vad Golden Promise-ban, kontroll körülmények között.

A transzgenek hatását az endogén *CBF* génekre a hideg-indukálható *HvCBF1*, *HvCBF6* és *HvCBF9* expressziójának vizsgálatával tanulmányoztuk. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy az Arabidopsis-hoz hasonlóan, árpaiban is létezik egy *CBF* auto-regulációs mechanizmus. Ennek a kérdésnek az igazolásához (vagy cáfolásához) azonban további kísérletek szükségesek.

A transzgenikus vonalak metabolomikai analízise

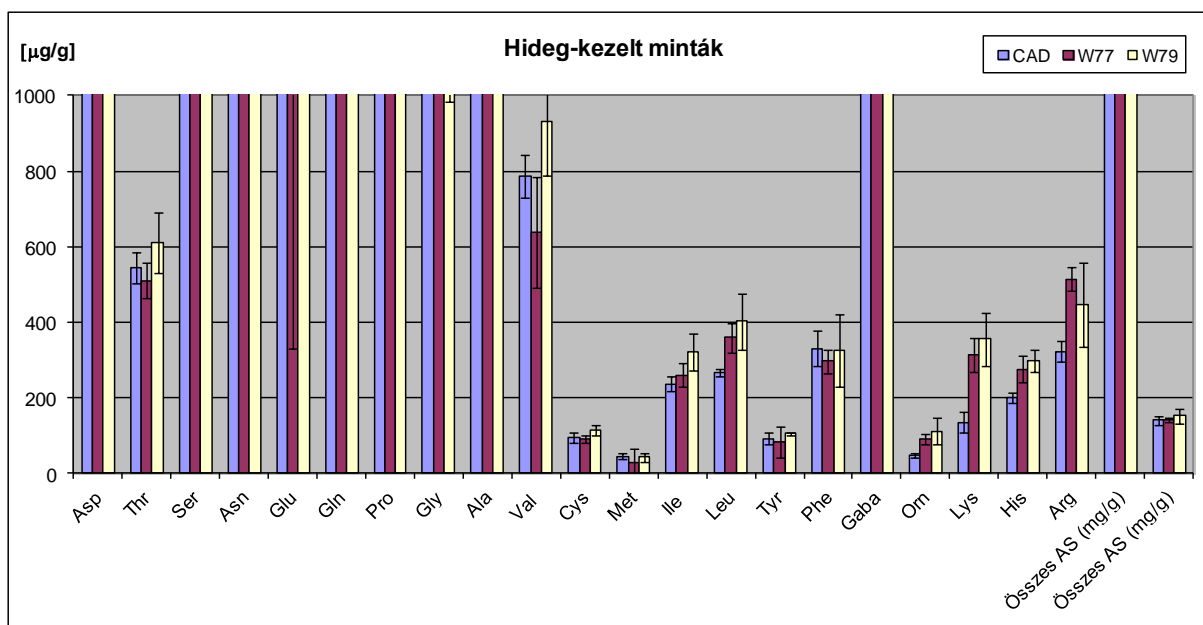
Mivel az alacsonyhőmérsékleti- és szárazság-stressz sejt szintű kivédésében alapvető szerepe van a membránoknak, ezért a fagytesztekben két legjobbnak bizonyult búza (és a nem-transzformáns Cadenza) vonalakat hideg- és szárazság-stressznek tettük ki, majd lipid komponenseket mértünk. Azonban ebben az előkísérletben értékelhető különbségeket nem találtunk.

A fent említett stresszek kivédésében az ozmotikusan aktív molekuláknak is kiemelkedő szerepük van. Ezért szénhidrát és szabad aminosav meghatározásokat is végeztünk. Mind búzában, mind árpaiban mértük a glükóz, fruktóz, szaharóz és fruktán tartalmat. Legmarkánsabb különbséget a szaharóz tartalomban tudtunk kimutatni (5. ábra). Az aminosav analízis rámutatott, hogy vannak olyan vegyületek (pl. leucin, ornitin, arginin, stb.), amelyek hideg hatására nagyobb mértékben akkumulálódnak a transzgenikus búzában (6. ábra). Mivel ez az előkísérlet csak két vonalon történt, ezért érdemes lesz az analízist kiterjeszteni.



5. ábra.

Szaharóz akkumuláció a hideg- és szárazság-stressznek kitett ciszgenikus árpa (A) és búza (B) vonalakban.

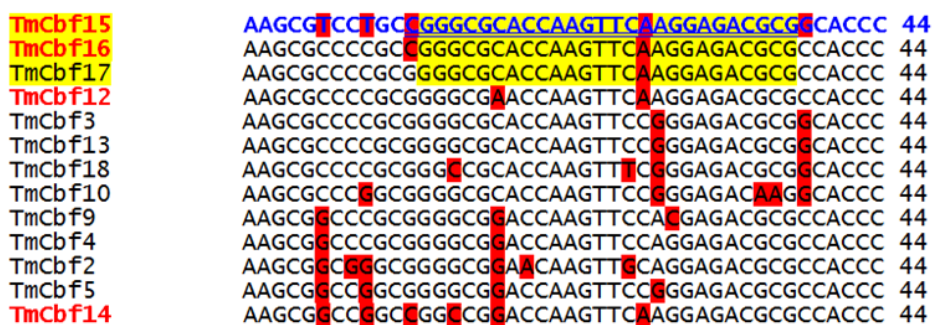


6. ábra

Hideg hatására történő aminosav akkumuláció ciszgénikus búzában és a Cadenzában.

Géncsendesítés

A *CBF* gének szerepét búzában indirekt módon, géncsendesítéssel is bizonyítani akartuk. A transzformációhoz használt konstrukciókat a géncsendesítésre kifejlesztett pBract207 Gateway alapú „hairpin” vektorban hoztuk létre. Mivel a géncsendesítés hatékonysága ideális esetekben sem 100%-os, ezért olyan konstrukciókat hoztunk létre, amelyek nem egyetlen *CBF* gén, hanem néhány, elsősorban a jelölt *CBF* gének csendesítésére alkalmasak. A *CBF15* gén csendesítésére tervezett konstrukció például a *CBF16* és *CBF17* géneket is csendesíti (7. ábra).



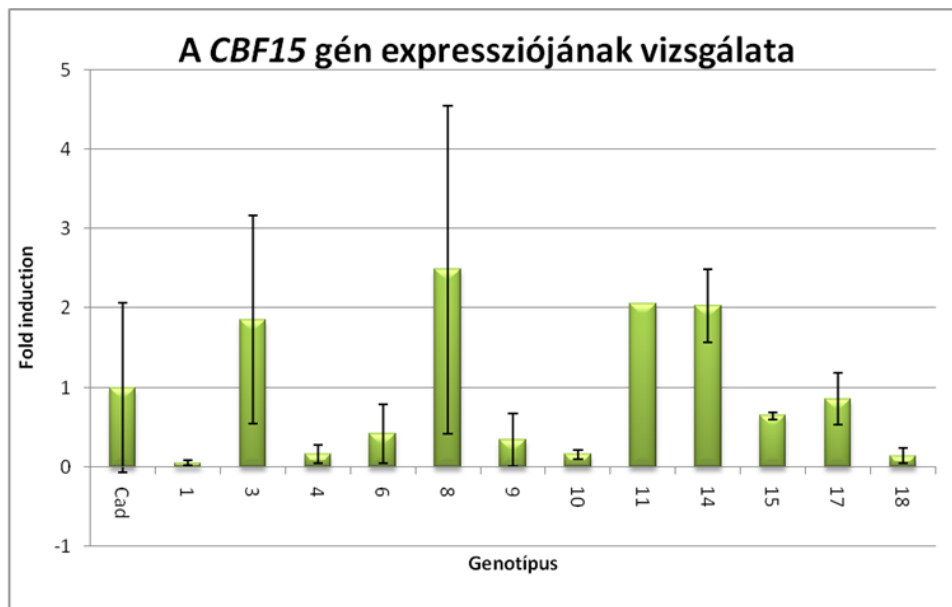
7. ábra

A *CBF15* gén csendesítésére tervezett konstrukció két másik *CBF* gént is (*CBF16* és *CBF17*) csendesíthet.

Előállítottuk a *CBF14* és *CBF15* géncsendesítésen alapuló kísérletekhez a búza ciszgénikus növényeket. Kezdetben mintegy harminc független vonal állt rendelkezésünkre. Meghatároztuk az egyes vonalakban a cisz-gén kópiaszámát. A vonalakat fagytesztnek vetettük alá, hogy azonosítsuk közülük azokat, melyekkel a későbbiek során érdemes lesz foglalkoznunk. Ez az előzetes teszt azonban nem hozott érdemleges eredményt.

Ezért a kérdést a másik oldalról kezdtük el megközelíteni, azaz azokat a vonalakat igyekeztünk azonosítani, amelyekben igazolható az adott cisz-gén expressziójának csökkenése. Ezért a két *TaCBF* gén expressziójának tanulmányozásával vizsgáltuk, hogy a géncsendesítéses vonalakban valóban lejátszódik-e a *CBF* gének kifejeződésének gátlása. Kontroll és hidegkezelt mintákat állítottunk elő valamennyi transzformáns vonalból, és a kísérletben résztvevő növényeket genotipizáltuk. Ennek során találtunk olyan vonalakat, amelyeknek a T1 nemzedékében nem tudtuk kimutatni a transzformációhoz használt konstrukció szekvenciájának semmilyen darabját, tehát nem tudtuk igazolni a transzgén beépülését, vagyis ezek a vonalak nem stabil transzformáns vonalak, ezért a további kísérletekből ezeket kizártuk. Mivel szegregáló populációval dolgoztunk, ezért a genotipizálás biztosította, hogy csak olyan növényekben nézzünk expressziót, amelyekben a csendesítés „teoretikusan” működik.

Real-Time RT-PCR-rel vizsgáltuk a búza *CBF* gének közül a *CBF12*, *CBF14*, *CBF15*, *CBF16* és a *CBF17* gének expresszióját, valamint a *CBF* gének által szabályozott *COR14b* és *WCS120* gének megnyilvánulását is. A mért értékek alapján a vad típushoz képest a *TaCBF* transzformáns vonalak közül nem találtunk olyat, amelyben működött a *CBF14* gén csendesítése, viszont egyes vonalakban a *CBF15* gén expressziója jóval kisebb volt, mint a vad típusban, ezért azt mondhatjuk, hogy működött a *CBF15* gén csendesítése (8. ábra).



8. ábra

A CBF15 gén expressziójának vizsgálata Real-Time RT-PCR módszerrel. Az az egyes transzformáns vonalak értékei a nem-transzformáns Cadenzához vannak hasonlítva.

A *COR14b* és *WCS120* gének vizsgálata során kimutattuk, hogy egyes transzformáns vonalakban a *COR14b* gén expressziója csökkent, míg a *WCS120* gén expressziója nem mutatott jelentős eltérést a vad típustól. A *CBF16* és a *CBF17* gének expressziós értékei alapján azt tapasztaltuk, hogy azokban a transzformáns vonalakban, amelyekben a *CBF15* gén csendesítése működött, ott feltételezhetőleg működött a többi vizsgált *CBF* gén csendesítése is. Tehát a *CBF14* és *CBF15* gének kifejeződésének gátlására tervezett konstrukció más nagyon hasonló nukleotid sorrenddel rendelkező *CBF* génekre is kifejthetik hatásukat.

Az expressziós vizsgálatok rámutattak arra, hogy, ha a *CBF14* gén csendesítése nem is működött, de működött a csendesítés a *CBF15* gén esetében. Ezen vonalak fagytesztje azonban nem mutatott különbséget, azaz a csendesített vonalakban nem különbözött (nem

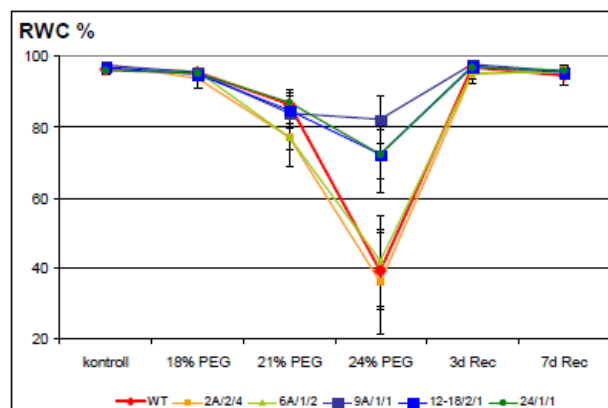
volt kisebb mértékű) a fagyállóság. E pályázattól függetlenül teszteltünk olyan tetraploid búzavonalakat, amelyekben az egyik genom **összes CBF** génje **deletált** volt. Ebben az esetben sikerült a fagyállóság csökkenését kimutatnunk, de ez a különbség **nagyon csekély** volt. Ez rámutat arra, hogy nem meglepő, ha **néhány CBF** gén **csendesítése** (nem teljes mértékű kiiktatása!) nem mutatható ki fenotípusosan (az alkalmazott metodikával).

Egyéb abiotikus stressz-tolerancia tesztek

Bár a kutatás előzményei során nem volt semmilyen indikáció arra, hogy az általunk vizsgált transzkripciós faktorokat kódoló *CBF* gének a fagyűrésen kívül más abiotikus stressz-tolerancia kialakításában is szerepet játszanának, igyekeztünk más stresszekben is vizsgálni a transzgenikus vonalak toleranciáját. Mivel irodalmi adatok alapján bizonyos *CBF* gének az ozmoregulációban játszanak szerepet, ezért elsősorban e kérdéskörre koncentráltunk.

Ozmotikus stressz-tolerancia teszt

Ozmotikus stresszt polietilén glikol 6000 (PEG) segítségével idéztünk elő, melynek koncentrációját fokozatosan növeltük a tápoldatban. Két-két olyan *TaCBF14* (6A/1/2 és 24/1/1) és *TaCBF15* (9A/1/1 és 12-18/2/1) transzformáns vonalat, amelyek a fagyteszt során ellenállóbbnak bizonyultak; a transzformáns kontroll vonalat (2A/2/4), és a vad típusú Golden Promise árpat (GP) vontuk be a kísérletbe. A PEG kezelés és az azt követő regenerációs periódus során mértük a vonalak levelének relatív víztartalmát (RWC). Sikerült olyan vonalat azonosítanunk, melyek – bizonyos koncentrációjú stressz esetén – toleránsabbnak bizonyultak, mint a nem transzformáns árpa (9. ábra). A PEG kezelés hatására a 9A/1/1, a 12-18/2/1, és a 24/1/1 vonalak levelének relatív víztartalma szignifikánsan nagyobb volt a vad típusban mérténél. Eredményünk arra enged következtetni, hogy a tanulmányozott *TaCBF14* és *TaCBF15* transzkripciós faktoroknak szerepe lehet a szárazságtűrés kialakításában, az ozmotikus stressztűrés fokozásában. Ennek bizonyítására további kísérleteket kell végeznünk.



9. ábra

Az ozmotikus stressz-kezelés során mért relatív víztartalom (RWC) a vad típusú Golden Promise és a transzformáns vonalakban, növekvő PEG koncentráció esetén. A relatív víztartalmat a stresszt követő 3. illetve 7. napon is meghatároztuk.

Fiatalkori szárazság-stressz

Árpa transzgénikus vonalakat vízkultúrában neveltünk, majd a két hetes növényeket a folyadékából eltávolítottuk. Ezután különböző időpontban relatív víztartalom (RWC) meghatározásával jellemeztük a szárazságtűrést. Nem találtunk a vad, azaz nem-transzformáns növényekhez képest megnövekedett toleranciát.

Fejlett növénykori szárazság-stressz

A *TaCBF14* és *TaCBF15* géneket túltermelő búzavonalak szárazság-tűrésének tesztelését üvegházi körülmények között végeztük. A kísérletbe 3-3 transzformáns vonalat, egy transzformáns kontroll vonalat és a vad típusú tavaszi Cadenza genotípust vontuk be. A vízmegvonás hatását különböző fejlődési fázisokban vizsgáltuk. Az elültetett növények kontroll csoportját folyamatosan öntöttük. A növények második csoportját 3 hétig locsoltuk, majd 3-leveles állapotuktól 30 napra megvontuk tőlük a vizet, míg a harmadik csoportot a kalászás előtti periódusban tettük ki szárazság stressznek. Megállapítottuk a növénymagasságot, kalász-számot, főkalász szemszámot, mellékkalász szemszámot, a kalásonkénti ezerszemtömeget, szemszélességet, szemhosszúságot. Statisztikusan megbízható olyan különbségeket, melyek azt igazolnák, hogy a transzgénikus vonalak valamely paraméter alapján szárazságtűrőbbek lennének, nem találtunk.

Komplex stressz-tűrésű vigora teszt (CSVT, Complex Stressing Vigour Test)

A teszt alatt együttesen alkalmaztunk oxigénhiányt és hideg-stresszt azáltal, hogy a szemeket négy napon keresztül vízben áztattuk, ebből az első két nap szobahőmérsékleten (20°C), a második két napon hidegben (2°C). A vizsgálattal az egyes árpa vonalak csírázáskori vigora közti eltérést kerestük, de nem találtunk különbséget.

Transzgénikus anomália: eltérő fejlődési ütem, kalászoslási idő

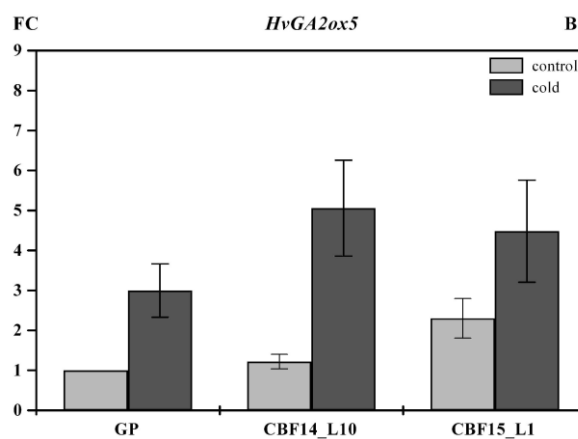
A transzformáns búza és árpa vonalak felszaporítását üvegházi körülmények között végeztük el. A vad típushoz képest fejlődésbeli visszamaradottságot, lassabb növekedést és késői virágzást tapasztaltunk a fagytesztek alapján szelektált *TaCBF14* és *TaCBF15* transzkripciós faktort túltermelő árpavonalak üvegházi felszaporításakor. Nem mutattunk ki egyenes arányú korrelációt a visszamaradottság és a fagyállóság mértéke között. Az ellenállóbb transzgénikus vonalak mindegyike kisebb-nagyobb mértékben lemaradást mutatott a fejlődésében (2. táblázat).

		Kontrol	CBF14	CBF14	CBF14	CBF14	CBF15	CBF15	CBF15
	GP	2A/2/4	6A/1/2	21B/1/1	23A/2/1	24/1/1	9A/1/1	12B/2/1	17/3/1
89 th	47	47	41	47	41	41	39	39	47
105 th	55	55	45	53	41	41	41	41	53
119 th	59	59	57	57	53	53	45	45	57
132 th	73	73	57	57	53	55	53	53	57
145 th	77	77	59	59	55	57	55	55	59

2. táblázat
A transzgenikus árpavonalak fejlődése a kalászolás időszakában - Zadoks skálán megjelenítve

A transzformáns kontroll és néhány transzformáns vonal a vad típusúval egy időben kezdett kalászolni, és fejlődésük során nem volt eltérés a növények magasságában.

A növekedést befolyásoló gibberellin sav anyagcsereút meghatározó gégeinek expressziós analízise igazolta, hogy nem maga a transzformáció, vagy a konstitutívan expresszáldó szelektációs markergén okozott zavart a fejlődésben, hanem a *TaCBF* transzgen kifejeződése. A *HvGA20ox1*, a *HvGA20ox3*, a *HvGA20ox4* és a *HvGA20ox5* gének expresszióját tanulmányozva kimutattuk, hogy hideg hatására a *HvGA20ox5* kifejeződése jelentősen megnőtt a transzgenikus vonalakban (10. ábra). Valószínűleg ez a megnövekedett génaktivitás a bioaktív gibberellin sav inaktiválásához vezetett, ami fejlődési lemaradást eredményezett.



10. ábra

A *HvGA20ox5* gén kifejeződése kontrol körülmények között és hideg hatására a Golden Promise nem-transzgenikus, valamint egy-egy transzgenikus árpa vonalban.

Specifikus anyag előállítása további vizsgálatokhoz

A szövettenyésztésből származó, regenerált növények közötti különbségek eredhetnek a szomaklonális variabilitásból is. Azért, hogy kiküszöböljük az esetlegesen előforduló szomaklonális variabilitás okozta különbségeket, a szelektált transzformáns árpa vonalainkat visszakeresztettük az eredeti, vad típusú Golden Promise tavaszi árpával. E munka során egy

transzformáns kontroll, továbbá 3-3 *TaCBF14* és *TaCBF15* transzformáns vonal BC1F2 nemzedékét állítottuk elő, amivel a célunk az volt, hogy olyan genetikai anyagot állítsunk elő, mely a későbbiek során microarray vizsgálatokra is alkalmas legyen.

Ezen túlmenően, a fagytesztekben két legellenállóbbnak bizonyult *TaCBF14* és *TaCBF15* transzformáns vonal összekeresztelését is elvégeztük. Gén kópiaszám követéssel kiválogattuk a homozigóta növényeket, azokat felszaporítottuk, így a két búza *CBF* gén együttes túltermeltetésének hatását is tanulmányozni tudjuk transzgenikus árpában.

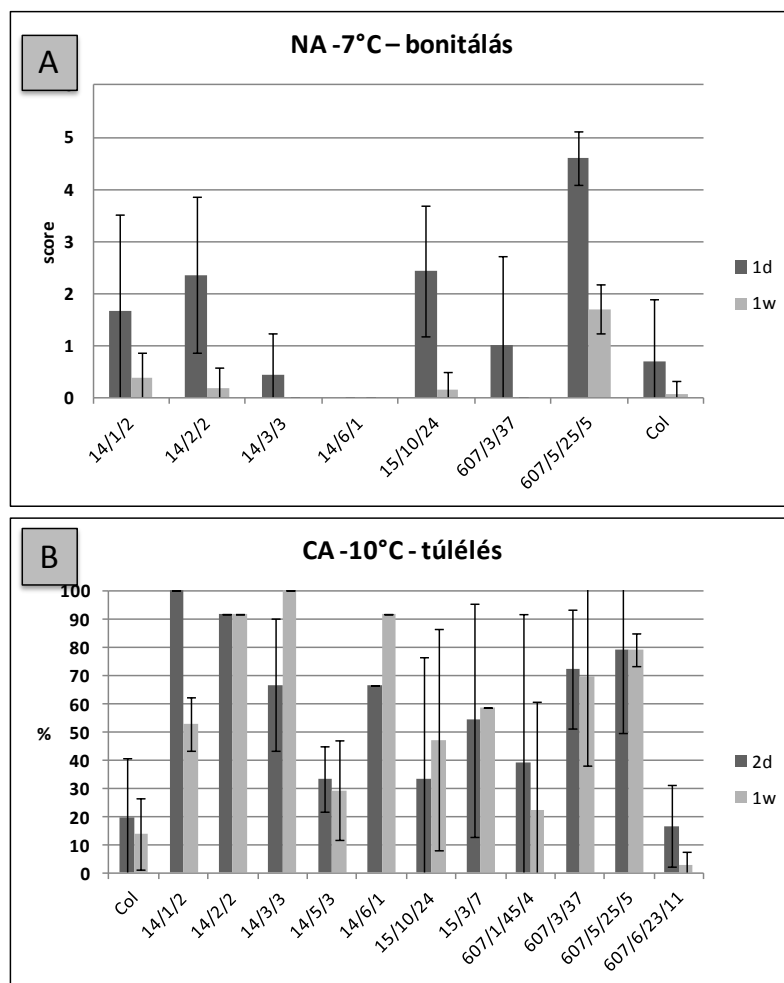
Transzgenikus Arabidopsis vonalak létrehozása, fenotípusos analízise

Arabidopsis transzformálás céljára kezdetben három konstrukciót hoztunk létre, amelyek pCAMBIA vektorba épített búza *CBF14*, *CBF15* és *CBF16* cDNS-eket tartalmaztak. A gének megnyilvánulását a konstitutív 35S promóter irányította. A konstrukciókkal Arabidopsis növényeket transzformáltunk, majd a transzgenek jelenlétét PCR-rel bizonyítottuk. A pCAMBIA vektorba épített, konstitutív 35S promóter által irányított, teljes hosszúságú búza *CBF15* cDNS kifejeződésének hatását fagyűrésre, só és szárazságtűrésre teszteltük. Több független transzgenikus vonal tesztelése után arra a következtetésre jutottunk, hogy egyik stresszfajtára vonatkozóan sem emelkedett meg a növények ellenálló képessége. Mivel a transzgenikus vonalak élettani tesztjei – a várakozásainkkal ellentétben – nem hoztak eredményt, ezért molekuláris módszerekkel ellenőriztük a beépített konstrukciókat. Megállapítottuk, hogy a *CBF15*-ös vonal minden szempontból megfelelő, de a *CBF14* és *CBF16* konstrukciókból hiányzik a gén kifejeződéséhez szükséges promóter több funkcionális eleme is. Ezzel magyarázható tehát, hogy e két transzgenikus vonallal nem kaptunk eredményeket. Új vektor konstrukciókat hoztunk létre; mindhárom tanulmányozandó *CBF* gént pMDC32 vektorba klónoztuk, a konstrukciók szerkezetét minden szempontból ellenőriztük, majd bimbó infiltrációs módszerrel Arabidopsis növény transzformációt végeztünk velük.

Az első évben készített, konstitutív expressziójúnak szánt búza *CBF14*, *15* és *CBF16* transzgeneket tartalmazó Arabidopsis növények vizsgálatánál feltűnt, hogy a *CBF16* konstrukcióval igen kevés transzformánst kaptunk, a néhány szelektált növény is törpe, illetve fél-törpe volt, rossz virágzási potenciállal. Bár a *CBF16* gén a 35S promóter nélkül legfeljebb igen alacsony szinten expresszálnak a konstrukcióban, a tapasztalat szerint ennek is hatása lehet a növény fenotípusára. A felnevelt és termőképes egyetlen féltörpe növényvonal viszont szárazság-stresszel szemben ellenállónak bizonyult. Mivel a növény fenotípusa igen hasonló az irodalomban *CBF* túltermelő növényekre leírtakhoz, feltehető, hogy valóban a *CBF16* gén hatását láttuk. Mivel azonban több transzformánst a konstrukcióval ismételt próbálkozás után sem sikerült kapnunk, ezért az első évben klónoztunk, (stressz-indukálható) *COR15A* promótert kapcsolunk a *CBF16* génhez. Ezzel a konstrukcióval már sikeres Arabidopsis transzformációt végeztünk. Az időközben megismételt, konstitutív *CBF14*, *15* és *16* konstrukciókkal történt Arabidopsis transzformációk (pMDC32 vektor) közül a *CBF16* cDNS-el ismét nem kaptunk transzformánsokat, ami igazolta megközelítésünk helyességét. Az ismételt Arabidopsis transzformációs kísérletek eredményeképpen a bizonyítottan helyes konstitutív (*CBF14*, *15*) génkonstrukciókat tartalmazó túltermelő növényvonalak mellett már rendelkezésünkre állnak indukálható promótert tartalmazó (*CBF16*) vonalak is. A transzgenikus vonalakban a transzgen működését RT-PCR-rel igazoltuk.

Az ily módon előállított transzgenikus Arabidopsis vonalak fagyállóságának tesztelését a kutatás negyedik évében végeztük, három alkalommal. Kétféle fagytesztet alkalmaztunk; az egyik típusban a növények nevelése során nem alkalmaztunk hideg-edzést, míg a másik típusú tesztben igen. Irodalmi adatokat figyelembe véve olyan hőmérsékletet

kerestünk, amely kellően differenciáló, azaz alkalmas arra, hogy a transzgén hatását (a megnövekedett fagyállóságot) kimutassa. A hideg-edzés nélkül alkalmazott fagyteszt estében a -6°C -os fagyasztás nagyon kis mértékben károsította csak a növényeket, míg a -8°C -os fagyasztás letális volt. A -7°C -on végzett fagyteszt volt az a hőmérséklet, ahol a növények károsodtak ugyan, de túléltek. Mi több ez a hőmérséklet alkalmasnak bizonyult arra is, hogy a nem transzformáns Colimba és a transzformáns vonalak fagyállósága között különbséget tegyen. Mindhárom transzgén esetében azonosítottunk olyan transzgénikus vonalakat, amelyeknek jobb volt a fagyállósága, mint a recipiens Columbia-é (11.A ábra). Meghatároztuk a hideg-edzést kapott növények estében is a kritikus hőmérsékletet, ami, mivel -8° és -9° esetében a növények nem károsodtak, míg -11°C estében elpusztultak, -10°C -nak bizonyult. Ez a hőmérséklet volt a differenciáló. A 11.B ábra mutatja a Columbia-nál jobb fagyállóságú transzgénikus növények túlélési adatait, míg a fenotípust, azaz a növények fagyteszt utáni habitusát az 12. ábra illusztrálja.



11 ábra.

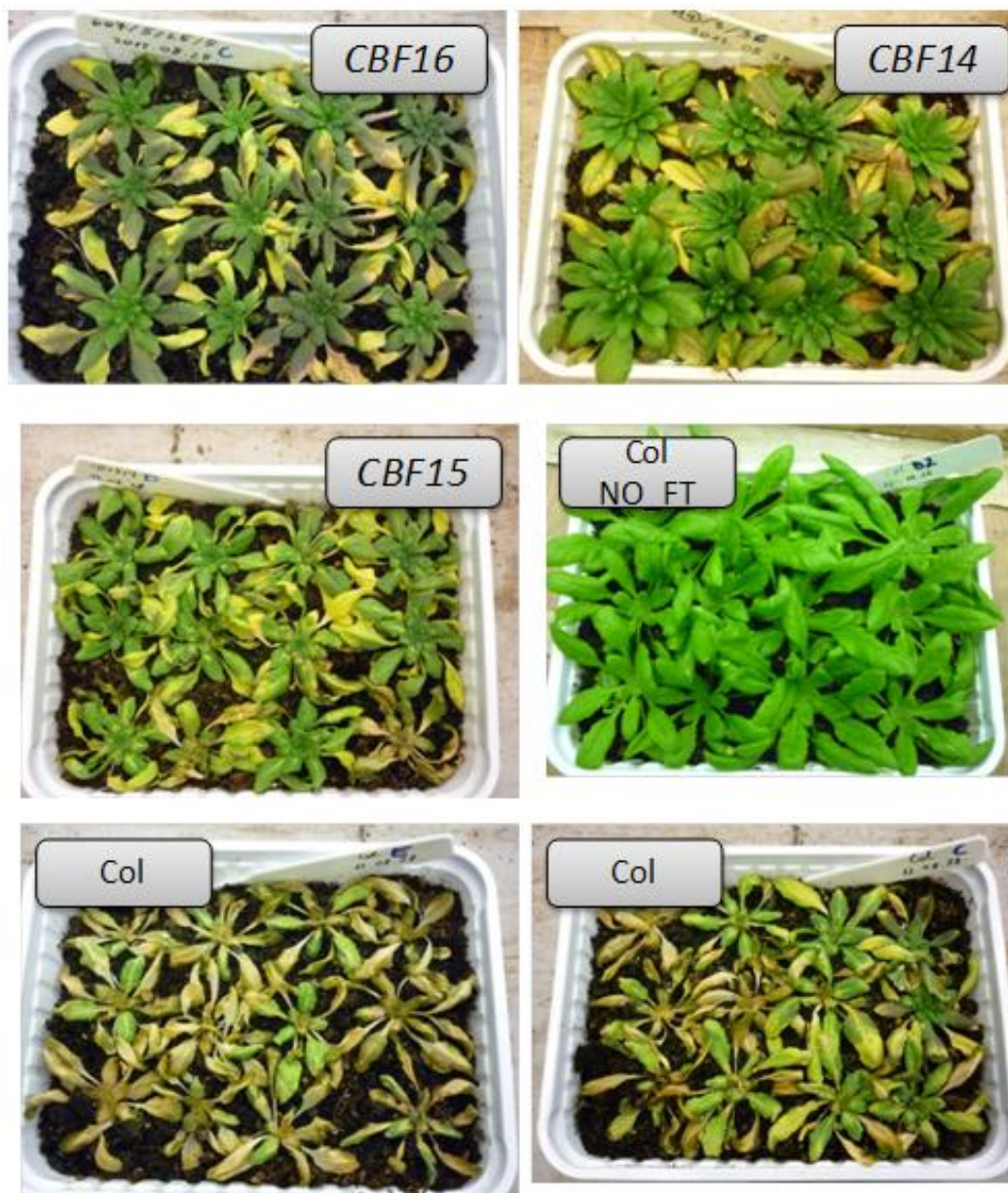
A panel: A hidegedzés nélkül -7°C -on kivitelezett fagyteszt eredménye.

Az értékelést egy 0-5 közötti skálán mutatjuk (0: elhalt, 5: sértetlen növény).

B panel: A hidegedzéssel -10°C -on kivitelezett fagyteszt eredménye, a túlélési százalékok (%) alapján.

Az értékelést a fagyteszt utáni regeneráció második napján (2d) és egy hét után (1w) végeztük el.

14/x/x: CBF14, 15/x/x: CBF15, 607/x/x: CBF16 transzgénikus vonalak, Col: nem transzformált, recipiens Columbia.



12. ábra

*A hidegedzéssel -10°C-on kivitelezett fagyteszt utáni növények fotója.
CBF14, CBF15 és CBF16: egy-egy transzgénikus vonal, Col: nem transzformált, recipiens
Columbia, Col NO-FT: fagytesztnek ki nem tett (kontroll) Columbia.*

Összefoglalás:

Munkánk során az előállított, az adott transzgént túltermelő *Arabidopsis*, árpa és búzavonalakkal végzett fagytesztekkel egyértelműen bizonyítottuk, hogy a tanulmányozott *CBF* géneknek fontos szerepe van a fagyállóság kialakításában. A géncsendesítésen alapuló kísérletek nem hoztak eredményt. A génexpressziós analízisek molekuláris szinten is igazolták, hogy a vizsgált gének szerepet játszanak a fagyállóság kialakításában; ezt látszik támogatni néhány metabolit akkumulációjának az analízise is.

Együtműködések, dolgozatok a pályázat kapcsán:

A pályázat munkálatai során a következő kollégákkal dolgoztunk együtt. Köszönet az önzetlen segítségükért!

Hazaiak:

- Dr. Jenes Barnabás (konstrukció-készítés, búza transzformáció); Növénybiotechnológiai Intézet, Növényi Sejtbiológia Csoport, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő
- Dr. Mihály Róbert (rizs transzformáció); Egyéb Kalászosok Nemesítési Osztálya, Kalászos Gabona Főosztály, Gabonakutató Nonprofit Kft. Szeged
- Dr. Kerepesi Ildikó (cukor-tartalom mérések); Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar
- Simonné Dr. Sarkadi Livia (aminosav-mérések); Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar

Külföldiek:

- Dr. Wendy Harwood és Mark Smedley; John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom
- Dr. Huw D. Jones és Caroline Sparks; Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire, United Kingdom
- Prof. Dr. Mick Fuller (*CBF* gének és az ozmotikus stressz kapcsolata); University of Plymouth, Drake Circus, Plymouth, Devon, United Kingdom

A pályázat anyagából a következő dolgozatok születtek:

- Faragó Zoltán (*BSc dolgozat*); Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék
- Ifj. Galiba Gábor (nyári gyakorlat); Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
- Tóth Evelin (*TDK*) Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
- Deák Csilla (*Diplomamunka*) Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
- Dr. Soltész Alexandra *doktori értekezés*; MTA ATK MGI