



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**STABIL GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓVAL ELŐÁLLÍTOTT
ÁRPA VONALAK ABIOTIKUS STRESSZTŰRÉSÉT ÉS
SZEMMÉRETÉT BEFOLYÁSOLÓ GÉNJELÖLTEK
VIZSGÁLATA**

Doktori (PhD) értekezés

ZOMBORINÉ NAGY BETTINA

**GÖDÖLLŐ
2016**

A doktori iskola

- Megnevezése:** Szent István Egyetem, Növénytudományi Doktori Iskola
- Tudományága:** Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok
- Program:** Növénynevelési és - biotechnológiai tudományok
- Vezetője:** Dr. Helyes Lajos,
Egyetemi tanár, intézetigazgató
az MTA doktora,
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Kertészeti Technológiai Intézet
- Témavezető:** Dr. Horváth Gábor
Tudományos főmunkatárs,
Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet
Növényi Növekedés Molekuláris Szabályozása Csoport

.....
Dr. Helyes Lajos
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Horváth Gábor
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
2.1. Az árpatermesztés agronómiai jelentősége	10
2.2. Stresszfolyamatok a növényekben	10
2.3. Az árpa szárazságtűrésében szerepet játszó faktorok, génjelöltek azonosítása EcoTilling módszerrel	12
2.4. Az árpa genetikai transzformációja: módszertani és történeti áttekintés	13
2.4.1. Az árpa biolisztikus elven alapuló közvetlen genetikai transzformációja.....	16
2.4.2. Az árpa <i>Agrobacterium tumefaciens</i> által közvetített genetikai transzformációja	17
2.5. Abiotikus stresszrezisztencia kialakítására irányuló biotechnológiai törekvések	18
2.5.1. A sejtstruktúra megőrzését szolgáló fehérjék alkalmazása.....	19
2.5.2. Ozmotikus védelmet biztosító vegyületek (ozmolitok) szintetizáltatása.....	20
2.5.3. A vízhiányt kísérő jelátviteli és génexpressziós szabályozó elemek (transzkripciós faktorok) felhasználása	21
2.5.4. Károsító molekulák hatástalanítását biztosító mechanizmusok javítására irányuló törekvések	23
2.6. A növényi stressz tolerancia mérésének lehetőségei.....	26
2.7. A termésjellemzők javítására irányuló transzformációs eredmények	30
2.7.1. Szemméret meghatározásában szerepet játszó gének jellemzése	32
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	35
3.1. Növénynevelés, növényanyag.....	35
3.2. Transzformációhoz használt konstrukciók előállítása	35
3.2.1. A kompetens sejtek transzformálása plazmid DNS-sel	36
3.3. Árpa transzformáció.....	37
3.4. Genomi DNS izolálás növényi mintákból	37
3.5. PCR.....	37
3.6. RNS izolálás, cDNS-szintézis és valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripciós PCR (RT-qPCR)	38
3.7. Fehérjekivonat készítése és immunoblot analízis	38
3.8. A vizsgált MsALR termelő árpavonalakban a transzgén kópiaszámának meghatározása	39
3.9. Tranzien expressziós tesztrendszer anyagai és módszertana: részecskebelövés és stressz kezelés.....	40
3.10. GFP és DsRED expresszálo epidermisz sejtek mikroszkópos detektálása.....	41
3.11. Klorofill és karotinoid tartalom meghatározása.....	41
3.12. Mintavétel a prolin és TBARS mérésekhez.....	42
3.12.1. Prolin tartalom meghatározása	42
3.12.2. TBARS mérések.....	43
3.13. A pixel alapú szemméret jellemzés digitális fotográfiával	43
3.14. Statisztikai analízis.....	44
4. EREDMÉNYEK.....	45
4.1. Az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját géneinek expressziós vizsgálata	45
4.2. A stabil árpa transzformációhoz szükséges konstrukciók előállítása, árpa transzformáció az <i>MsALR</i> génnel.....	48

4.2.1. A transzformáns növények molekuláris jellemzése, a transzgén beépülésének igazolása	52
4.2.2. A transzgén kópiaszámának meghatározása	55
4.3. Az MsALR fehérjét termelő árpa vonalak stressztűrő képességének fluoreszcencia detekciós módszeren alapuló vizsgálatának optimalizálása	55
4.3.1. A citoszólban felhalmozott MsALR fehérje hatása a transzgenikus árpa szárazság, só és direkt karbonil stresszre adott válaszreakcióiban	58
4.3.1.1. A fotoszintetikus pigment tartalom változása	61
4.3.2. A kloroplasztiszban felhalmozott MsALR fehérje hatása a transzgenikus árpa szárazság, só és direkt karbonil stresszre adott válaszreakcióiban	63
4.3.2.1. Fotoszintetikus pigment tartalom változása	65
4.4. Az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgenikus vonalon mért prolin és tiobarbitúrsav reaktív származékok felhalmozódásának mértéke az alkalmazott stresszhatásokra	66
4.5. Prolin és TBARS felhalmozódásának mértéke az MsALR fehérjét a kloroplasztiszban felhalmozó transzgenikus vonalon végzett stresszkísérletek hatására	71
4.6. Árpa stabil genetikai transzformációja a GW2 gén csendesítésére	75
4.6.1. Az ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 transzformáns árpavonalak génexpressziós vizsgálata	76
4.6.2. A transzgenikus növények fenotípusos jellemzése	78
4.7. Új tudományos eredmények	83
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	85
5.1. Az árpa szárazságtűrésében szerepet játszó génjelöltek azonosítása	85
5.2. Árpa transzformáció <i>Agrobacterium tumefaciens</i> közvetítésével	87
5.3. Tranziens génexpressziós tesztrendszer az <i>MsALR</i> gén abiotikus stresszválaszban betöltött szerepének bizonyítására	88
5.4. Árpa stabil genetikai transzformációja a <i>GW2</i> gén csendesítésére	92
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	95
7. SUMMARY	99
8. MELLÉKLETEK	103
M1. Irodalomjegyzék.....	103
M2. Alkalmazott primerek listája	125
M3. A transzformációhoz használt embrióizoláló, kalluszindukciós és növényregeneráló táptalajok összetétele.....	126
M4. Baktérium növesztéshez használt táptalajok és tápoldatok összetétele, alkalmazott antibiotikum koncentrációk.....	128
M5. Fénykép melléklet	129
M6. Szekvencia analízisek.....	134
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	137

JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
ABA	Abscisic acid, abszcizinsav
AKR	Aldo-keto reductase enzyme family, aldo-keto reduktáz enzimes család
AR	Aldose-reductase, aldóz-reduktáz
AREB/ABF	ABA-responsive element-binding protein/ABA binding factor, ABA-függő elemek-kötő fehérje/ABA kötő elem
<i>AtNF-YB1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> nuclear transcription factor Y subunit B-1, lúdfű Y sejtmagi faktor családba tartozó TF
BMV	Brome mosaic virus, Bromovirus, rozsnok mozaik vírus
BSMV	Barley Stripe Mosaic <i>hordeivirus</i> , árpa csíkos mozaik vírus
<i>bZIP</i>	Basic leucine zipper, bázikus leucin cipzár (transzkripció faktor)
CaMV35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S, Karfiol Mozaik Vírus 35S
CAT	Catalase, Kataláz
CBF/DREB	C-repeat-binding faktor/dehydration-responsive element binding protein, C-ismétlődést kötő elem/Dehidratációra válaszoló kötő fehérje (transzkripció faktorcsalád)
cDNA/cDNS	complementary Deoxyribonucleic acid, kópia-DNS, komplementer DNS
CDPK	Calcium-dependent protein kinase, kalcium-függő protein kinázok
CO ₂	szén-dioxid
COR	Cold-responsive protein, hideg függő fehérje
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide, cetil trimetilammónium bromid
<i>CsIF</i>	Cellulose synthase-like F gene, cellulóz-szintáz szerű gén (F alcsalád)
<i>DHPS</i>	Dihydrodipicolinate synthase, dihidropikolinát-szintáz
<i>Dhn12,13</i>	Dehydrin12/13, dehidrin 12/13
Dikamba	3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid, 3,6-diklór-2-metoxi-benzoésav
DNS	Deoxyribonucleic acid, dezoxiribonukleinsav
DsRED	<i>Discosoma sp.</i> RED, vörös fluoreszcens protein
<i>Gn1</i>	Grain number1, szemszám1 gén
<i>GS3</i>	Grain size3, szemméret 3 gén
<i>GFP</i>	Green fluorescent protein, zöld fluoreszcens fehérje
<i>Ghd7</i>	Grain number, plant height, heading date gene7, Szemszám, növénymagasság és kalászolási időt befolyásoló gén
<i>GPX</i>	Glutathione peroxidase, glutation-peroxidáz
<i>GW2</i>	<i>Grain Weight 2</i> (gén), szemsúly meghatározásában szerepet játszó gén
HIGS	Host Induced Gene Silencing, gazdaszervezet indukált géncsendesítés
Hsp	Heat shock protein, hősokk fehérje
<i>HsAKR1B1</i>	<i>Homo sapiens</i> Aldo-keto reductase family 1 member B1, humán aldóz reduktáz gén
<i>HvA1</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. aleuron 1, késői embriogenezisben gyakori, ún. LEA fehérjét kódoló gén
<i>HvARH1</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. aldose reductase homologue 1, árpa aldóz reduktáz homológ1 (gén)
<i>HvDREB1</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. dehydration responsive element binding protein 1, a dehidratáció során aktiválódó génszakaszhoz kötődő fehérjét kódoló gén
<i>HvDRF1</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. AP2 transcriptional activator gene, AP2 transzkripció faktort kódoló gén
<i>HvNHX1</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. mRNA for sodium/proton antiporter, nátrium-proton antiporter fehérjét kódoló gén
<i>HvP1</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. mRNA for vacuolar proton-inorganic pyrophosphatase, vakuoláris proton-inorganikus pirofoszfátáz fehérjét kódoló gén

<i>HvSRG6</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L. stress responsive gene protein 6, 6-os számmal jelzett fehérjét kódoló, stresszre reagáló gén
LB	Luria-Bertani táptalaj
LEA	Late Embryogenesis Abundant, késői embriógenézis fehérjék
<i>Lhcb1</i>	Light harvesting chlorophyll a/b binding protein complex, klorofil kötő fénygyűjtő protein komplex 1
MAP	Mitogen activated protein, mitogén aktivált fehérje (kinázok)
<i>MsALR</i>	<i>Medicago sativa</i> Aldose reductase, lucerna aldóz-reduktáz
MG	Methylglyoxale, metilglioxál
mRNS	Messenger-RNS, hírvivő-RNS
<i>mlo/Mla</i>	Mildew resistance locus o/a, Lisztharmat rezisztencia o/a lókuszt
<i>MYB/MYC</i>	Myeloblastosis/Myelocytomatosis oncogene, mieloblasztózis/mielocitomatózis onkogén (transzkripciós faktor)
<i>NAC</i>	Nitrogen assimilation control, nitrogén asszimiláció kontroll
NaCl	Natrium-chloride, nátrium-klorid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
<i>NOS</i>	Nopaline synthase, nopalinn szintáz
NPQ	Non photochemical quenching, nem fotokémia kioltás
<i>NPTII</i>	Neomycin phosphotransferase II, neomycin-foszfotranszferáz II
<i>OsTBI</i>	<i>Oryza sativa</i> Teosinte Branched1 gene, rizs bokrosodást befolyásoló gén
PCR	Polimerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PEG	Polyethylene glycol, polietilén-glikol
ΦPSII	Effective quantum efficiency of Photosystem II, kettes fotokémiai rendszer elektrontranszportláncának effektív kvantumhasznosítása
<i>PLD</i>	Phospholipase D, Foszfolipáz-D
<i>PX</i>	Peroxidase, Peroxidáz
<i>P5CS/P5CR</i>	Pyrroline-5-carboxylate synthase/reductase, 1-pirrolin-5-karboxilát-szintáz/reduktáz
QTL	Quantitative trait loci, kvantitatív jelleget meghatározó lókusztok
RNS	Ribonucleid acid, ribonukleinsav
ROS	Reactive oxygen species, reaktív oxigén származékok
RT-qPCR	Real time quantitative PCR, valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripciós polimeráz-láncreakció
SNP	Single nucleotide polymorphism, egy nukleotidnyi szekvencia polimorfizmus
<i>SOD</i>	Superoxide dismutase, szuperoxid-dizmutáz
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances, tiobarbitúrsav reaktív anyagok
EcoTILLING	EcoTargeting induced local lesions in genomes, természetes populációk egyedeinek genomjában meglévő eltérések kimutatásán alapuló technika.
TF	Transcription factor, transzkripciós faktor
VIGS	Virus induced gene silencing, vírus indukált géncsendesítés
<i>ZF-HD</i>	Zinc-finger homeodomain regulon, cink-ujj homeodomén
<i>ZmRAB17</i>	<i>Zea mays</i> Responsive to ABA 17 gene, kukorica ABA-függő 17 gén.

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A mezőgazdaság állandó problémája, hogy a környezeti, más szóval abiotikus stresszhatások (például a szárazság, a talaj sótartalma vagy szélsőséges hőmérsékletek) következtében a termés mennyisége erősen ingadozhat. A környezeti stresszekre adott növényi védekező mechanizmusok megismerése alapvetően fontos, hogy a termésbiztonságot szélsőséges környezeti feltételek között is fenn tudjuk tartani.

A szárazságtűrésre történő nemesítés egyik legfontosabb eszköze lehet a szárazságtűrés szempontjából kedvező hatású allélvariánsok megtalálása és ezek keresztezés során történő felhasználása. A kutatók által kiválasztott génjelöltek szerepének tisztázásában, illetve a szárazságtűrésre történő nemesítésben kulcslépés a genotípusok (értékes génvariánsokat hordozó növények és egyéb nemesítési anyagok) szárazságtűrő képességének megbízható meghatározása. Egyes gabonafajták, pl. rizs esetében már publikált eredmények is mutatták, hogy a stressz toleráns és stressz érzékeny fajták eltérő aldo-keto reduktáz génexpresszióval rendelkeznek. Munkánk során így arra szerettünk volna választ kapni, hogy a szárazságtűrő árpa genotípusok esetében tudunk-e hasonló irányvonalat kimutatni, illetve meg tudjuk-e adni ennek az esetleges különbözőségnek a genomikai hátterét. Ehhez kapcsolódóan az árpa 2 saját génjének (*Hordeum vulgare* L. aldóz reduktáz homológ 1 „*HvARH1*” és *Hordeum vulgare* L. 6-os számmal jelzett stresszre reagáló gén „*HvSRG6*”) szárazságtűrésében betöltött szerepét vizsgáltuk expressziós analízisek segítségével a Törjék Ottó munkacsoportja által korábban már különböző haplotípus csoportokba sorolt, szárazságtűrés szempontjából variábilis árpa genotípusokon.

Napjainkban a genetikai transzformáció a növényi funkcionális genomikai kutatások egyik kulcsmódszerévé vált. A dolgozat további részei az *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített génátviteli eljárás és a vele elért eredmények bemutatására törekszik. Konkrét, jelölt gének hatását, a gén elhallgattatásával (antiszensz), vagy túltermeltetésével határozhatjuk meg. Folyamatosan jelennek meg olyan közlemények, melyek bizonyos gének stressztűrésben betöltött szerepét igazolják. Ilyen gén például az általunk is vizsgált, lucernából izolált *ALR* (*Medicago sativa* aldóz-reduktáz, *MsALR*) gén, mely a stressz folyamatok során képződő reaktív aldehidek redukciójával, illetve ozmotikumok szintézisével védelmet nyújthat az abiotikus stresszek ellen. A lucerna eredetű aldo-keto reduktáz (AKR) -okat termelő transzgenikus növények igazoltan magasabb toleranciát mutattak többféle abiotikus stresszel szemben is, pl. szárazság (Oberschall et al. 2000), UV (Hideg et al. 2003), hő (Turóczy et al. 2011). A doktori munka során egyrészt azt vizsgáltuk, hogy a lucerna *ALR* enzim milyen mértékben tudja kifejteni ezt a védőhatást. Másrészt, hogy a reaktív karbonil vegyületek eltávolítása a

citoplazmában vagy a kloroplasztiszban fontosabb. Ennek eldöntésére olyan konstrukciót is létre hoztunk, mely lehetővé teszi az egyes detoxifikáló tulajdonságú fehérjék kloroplasztiszbba történő transzportját. A génjelöltet tavaszi árpaiban túltermeltettük és a megnövekedett génexpresszió hatását vizsgáltuk a transzformáns növény abiotikus (dehidratáció, só és karbonil) stressz-adaptációja során. A jellemzés alapját egy abiotikus stresszekre adaptált tranziens génexpresszió tesztrendszer (Marzin et al. 2008) képezte. Eredményeink a növényi stresszvédő mechanizmusok jobb ismeretét segítik, de befolyásolhatják az árpa növény termésbiztonságát, illetve más termesztett növények hozamának emeléséhez is hozzájárulhatnak.

Az abiotikus stresszhatásoknak ellenálló növények előállítása mellett a kutatások kiemelkedő fontosságú másik célja a terméspotenciál növelése is; így például a bokrosodási hajlam, a szemtermés méretének javítása, vagy a szemfeltöltődés folyamatának befolyásolása is fontos nemesítési szempont. Irodalmi adatok alapján kiválasztottunk egy gént, mellyel szintén az árpa szemméretét kívántuk befolyásolni. Választásunk a korábban rizsből izolált és jellemzett *GW2* (grain weight 2 gén, szemsúly meghatározásában szerepet játszó) génre esett. Antiszensz orientációban használva a transzformáció során a rizs szemek szélességének jelentős növekedésével szignifikánsan sikerült a szemtermés súlyát növelni, mely a szem vastagságában és hosszában bekövetkezett enyhe növekedéssel párosult (Song et al. 2007). Kutatásaink során a gén árpa homológjaival végeztünk transzformációs kísérleteket, hogy megbizonyosodjunk szemméret befolyásolásában betöltött szerepükről.

Az értekezés így több kutatási téma eredményeit foglalja össze, melynek fő célkitűzéseit az alábbi pontokban foglalom össze:

1. Az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek, a *HvARH1* és *HvSRG6* gének expressziójának vizsgálata abszcizinsav kezelés hatására.
2. A tavaszi árpa *Agrobacterium tumefaciens*-szel történő transzformációja, a technológia adaptálása és az elkészített konstrukciókkal stabil transzformáns árpavonalak létrehozása.
3. A lucernából izolált *MsALR* gén bináris vektorba építése olyan transzgenikus vonalak előállítása céljából, amelyek az ALR fehérjét a citoplazmában (*p6d35S-MsALR*) vagy a kloroplasztiszban (*p6d35S-cpMsALR*) halmozzák fel. A transzgén beépülésének és kifejeződésének bizonyítása és kópiaszámának meghatározása molekuláris módszerekkel.

4. Az *MsALR* gén abiotikus stresszválaszokban betöltött szerepének fluoreszcencia detekciós módszeren alapuló tanulmányozása a létrehozott stabil transzformáns árpa vonalak dehidratáció, só és karbonil stressztűrés vizsgálatain keresztül. A stressztolerancia mértékét igazoló fluoreszcens sejtarány értékeinek alátámasztása más biokémiai módszerekkel (klorofill tartalom, prolin, tiobarbitúrsav reaktív anyagok (TBARS) felhalmozódás mérése).

5. A szemméret befolyásolásában szerepet játszó *GW2* gén árpa homológjait antiszensz orientációban tartalmazó stabil transzformánsok létrehozása, a transzformáns vonalak jellemzése molekuláris biológiai módszerekkel. A vonalak fenotipizálása, szemméret pixel-analízisen alapuló vizsgálata.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az árpatermesztés agronómiai jelentősége

Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) egyszikű növény, a perjefélék (*Poaceae*), más néven a pázsitfűfélék (*Gramineae*) családjának, ezen belül az árpák (*Hordeum*) nemzetségének egyik legfontosabb képviselője. Termesztési területe alapján a kukorica, búza és rizs után a negyedik legfontosabb helyet foglalja el: ez a 2014-es évben 49,2 millió hektárt jelentett ([®]Statista 2015). Magyarországon közel 292 ezer hektáros vetésterülettel (Statisztikai Tükör 2014) a harmadik legnagyobb területen termesztett gabonafélének. Egyike a legrégebben domesztikált növényfajoknak: géncentruma Elő-Ázsiába tehető, termesztése régészeti leletek alapján kb. tízezer évvel ezelőtt kezdődött. Felhasználása sokrétű: jelentős mennyiséget; az összes termés körülbelül egyharmadát a söripar dolgozza fel és szintén számottevő mennyiséget használnak állattakarmányozási célra. Élelmiszeripari nyersanyagként koffeinmentes pótkávék készítésére, a rizs helyettesítésére szolgáló árpagyöngy (gersli) előállítására, valamint lisztte őrölve bébiételek, táplálékkiegészítők alapjául használják.

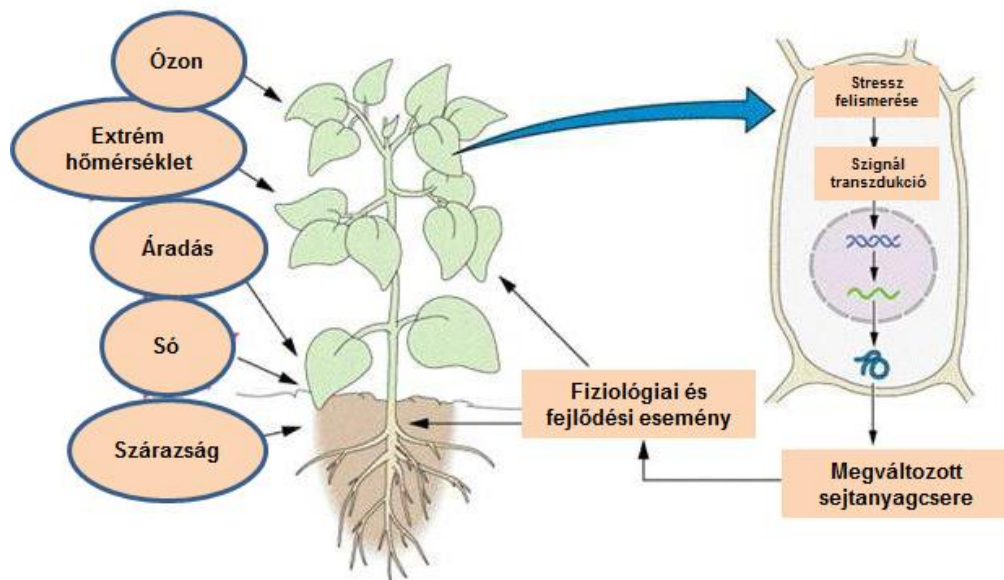
Az árpa agronómiai jelentőségét a búzánál nagyobb természetes ellenálló képessége adja: széleskörűen alkalmazkodik a megváltozott környezeti hatásokhoz (Nevo et al. 2012), melyből adódóan a szélsőséges időjárási körülmények (kevés csapadék, tengerszint feletti magasság, vagy a talaj sótartalma) között is nagyobb biztonsággal termeszthető, így stabil terméshozamot fenntartva a szegényebb országokban is jelentős élelmiszerforrást (Grando és Macpherson 2005) képez még az időjárási viszonyok ellenére is.

Míg az árpa genom szerkezetileg nagyon hasonló más gabonafélék genom felépítéséhez, a búzánál jelentősen kisebb genommérete (5,1 gigabázis), s valódi diploid volta miatt, továbbá a közelmúltban befejeződött genom szekvenálási (The IBGS Consortium 2012) programnak köszönhetően a biotechnológiai kutatások egyre gyakrabban alkalmazott genetikai modell-növényévé vált. A genom szekvenálási adatok felhasználása pedig újabb teret nyit a genom alapú kutatások és növénynemesítési kísérletek tervezésére.

2.2. Stresszfolyamatok a növényekben

A szárazföldi növények helyhez kötött életmódjuk miatt ki vannak téve az állandóan változó külső környezetből érkező hatásoknak, stresszfaktoroknak. A növények stresszhatás során mutatott válaszreakciója a stressz érzékelésével kezdődik, és egy komplex jelátviteli

rendszeren keresztül molekuláris, sejt szintű és fejlődési válaszreakciók megjelenését váltja ki. A *stressz* fogalmának meghatározására napjainkban is Selye János definíciója használható, amely szerint a stressz egy bizonyos szervezetnek a stresszorra (optimálistól eltérő környezeti viszonyra) adott nem specifikus szindrómában (tünetegyüttesben) megnyilvánuló állapota (Selye 1956). Később, Lichenthaler (1998) tovább pontosította a stressz fogalmát; szerinte stressznek tekinthető minden olyan körülmény, ami kedvezőtlen hatással van a növények anyagcseréjére, növekedésére, s ezáltal a fejlődésére. Ha a növényt stresszhatás éri, a lebontó folyamatok domináns megnyilvánulása mellett a vitalitás csökkenése figyelhető meg. Ezt követően - ha azt a növény rezisztencia-potenciálja (standard szint és rezisztencia minimum közötti eltérés mértéke) lehetővé teszi - bekövetkezik a második, azaz az ellenállás fázisa, mely során helyreáll a növény alapállapotban tapasztalható rezisztencia szintje és fokozódik az ellenálló képessége. Azonban ha a növényt érő stressz erőssége meghaladja a növény alkalmazkodó képességét, a kimerülés stádiuma következik, ami akár a növény pusztulásához is vezethet (Szigeti 1998). Növényi stresszhatást biotikus, illetve abiotikus tényezők idézhetnek elő. Előbbihez tartoznak a kórokozók és kártevők által előidézett stresszhatások, utóbbi csoportba pedig a hőmérséklet, fény és vízviszonyok optimálistól eltérő változásai sorolhatóak.



1. ábra: Abiotikus stresszhatásokra adott növényi válaszreakciók – sejt szinten és a teljes növény szintjén ábrázolva (Buchanan 2000. alapján újrarájzolva).

A növényi sejtekben a külső környezetből érkező ingerek felvétele és az általuk kiváltott anyagcsere-változások között sejt szinten szignál transzduciós folyamatok mennek végbe.

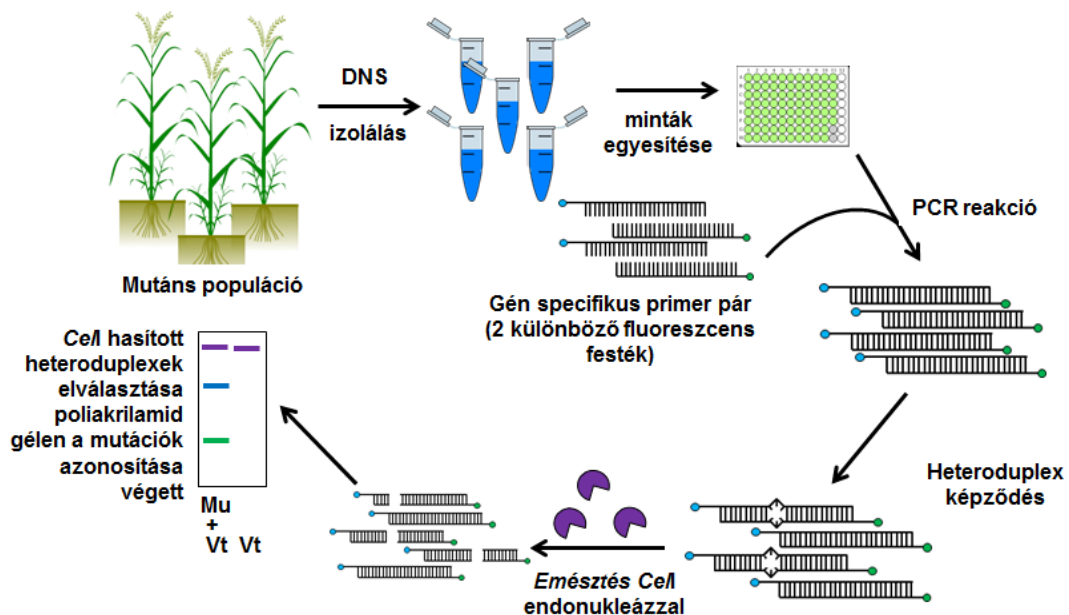
Ennek első lépése legtöbbször az érzékelés, zárólépése pedig egy fehérje vagy más anyagcsere-termék megjelenése/átalakulása, melynek eredményeként új funkciók jelennek meg. A környezeti jelek hatására elindult jelátviteli folyamatok jellemzően sejt szinten megváltozott génextpressziót eredményeznek, ami viszont befolyásolja az egész növény fejlődését.

Mivel a dolgozatomban első felében olyan génjelöltek vizsgálatával foglalkozom, amelyeknek elsősorban az abiotikus stresszek elleni hatékony védekezésben van szerepük, ezért a továbbiakban az ezekkel kapcsolatos kutatási eredményeket tekintem át.

2.3. Az árpa szárazságtűrésében szerepet játszó faktorok, génjelöltek azonosítása EcoTilling módszerrel

A gabonafélék, közöttük az árpa szárazság toleranciájának kialakításában résztvevő genetikai tényezők azonosítására, illetve részletes vizsgálatára különböző genetikai módszereket használnak, például QTL analízis, gén expressziós vizsgálatok, transzgenikus növények analízise (Guo et al. 2009; Talamè et al. 2007; Marzin et al. 2008). Ezen vizsgálati módszerek eredményei alapján többféle gén szárazság toleranciában betöltött szerepe valószínűsíthető. A különböző génjelöltek stressz toleranciában betöltött funkciója hitelt érdemlően azonban csak kevés esetben igazolható egyértelműen. A helyzetet nehezíti a vizsgált faj egyedei, genotípusai között fennálló genetikai variabilitás, mely az egy adott lokuszban megtalálható különböző allélvariánsok jelenlétéből adódik. A szárazságtűrésben szerepet játszó gének genetikai variabilitásának feltárása kínál lehetőséget az EcoTILLING technológia (Comai et al. 2004). A PCR lépéseken, heteroduplex képzésen és az allélvariánsok szekvencia különbségeinek nukleázokkal történő emésztéssel való kimutatásán alapuló technológia a haplotípusok elkülönítésére is lehetőséget nyújt. Segítségével az egyes inszerciók/delécioók (InDel), valamint egyetlen bázispárnyi eltérések (SNP) is kimutathatók a vizsgált populáció egyes tagjai között. A módszert árpa vonalak liztharmat (*Blumeria graminis*) rezisztenciában szerepet játszó gének (*mlo* és *Mla*) allélikus variabilitásának felkutatására Mejlhede et al. (2006) sikerrel alkalmazta, nemrégiben pedig Labadibi et al. (2009) indukált mutagenézissel előidézett misszensz mutációkról számolt be két dehidrin génben (*Dhn12* és *Dhn13* gének), amelyeket szintén e módszerrel azonosítottak. Xia et al. (2012) a klorofill a/b kötő fehérjét kódoló *Lhcb1* (light harvesting chlorophyll a/b binding1) gén allélikus variabilitását mutatta ki e módszerrel, továbbá összefüggést mutatott ki az allélvariációk, illetve a kalásonkénti szemszám, kaláshossz, az ezerszem tömeg, valamint növénymagasság között. Cseri et al. (2011) közleményében pedig egy - a szárazságtűrés szempontjából nagy genetikai variabilitást mutató - 96 genotípust tartalmazó árpa populációt vizsgált. A szárazságtűrésben potenciálisan szerepet játszó 6 génjelölt (*HvSRG6*, *HvNHX1* és a *HvP1*, *HvARH1*, *HvDREB1* és *HvDRF1* gének) természetes variabilitását EcoTILLING módszerrel analizálva a génjelöltek allélvariánsainak egyértelmű elkülönítésére alkalmas és könnyen detektálható markerkészletet hozott létre. A csoport munkájához kapcsolódóan

próbáltuk meghatározni a kiválasztott génjelöltek abszcizinsav (ABA) kezelés hatására adott expressziós változásait. Doktori értekezésemben – a csoportunk korábbi kutatási témáihoz kapcsolódóan – egy aldóz redukáz homológ gén: a *HvARH1* (*Hordeum vulgare* AR-h gene for aldose reductase), valamint az *HvSRG6* (*Hordeum vulgare* *Srg6* gene for Stress Responsive Gene protein 6) génjelöltekre esett választásunk. Az EcoTilling módszer segítségével a gének szekvenciájában felfedett SNP és InDEL mutációk helyének pontos meghatározása után, a vizsgált tájfajtákat az adott génjelöltek esetében további - a genotípusokon belül leggyakrabban előforduló - haplotípus osztályokba sorolták.



2. ábra: Tilling módszer folyamatábrája. Mu: mutáns, vt: vad típus. (Forrás: Till et al. 2004. alapján újrarájzolva)

2.4. Az árpa genetikai transzformációja: módszertani és történeti áttekintés

A géntechnológiai módszerek rohamos fejlődésének köszönhetően újabb lehetőségek nyílnak nemcsak a növények ellenálló képességének fokozására (gyom- és kártevő-ellenállás, egyéb a környezeti stressz hatásokkal - például szárazság, hideg - szembeni tolerancia), hanem az árpa minőségi paramétereinek javítására, ezáltal pedig a nagyobb terméshozamok elérésére. Az alap és alkalmazott kutatás fontos, számos kérdésre választ adó eszköze a transzgenikus árpák létrehozása. Bár az árpa biotechnológiai kutatásai távoli múltat tekintenek vissza, a biotechnológiai, sör- és malátagyártási, valamint takarmányozási céloknak megfelelő fajták előállítására számos transzformációs módszer áll rendelkezésre.

Az első transzgenikus növényeket 1983 -ban állították elő (Bevan et al. 1983). Az elmúlt évtizedekben a transzgenek bejuttatására sokféle módszert dolgoztak ki és publikáltak, melyek

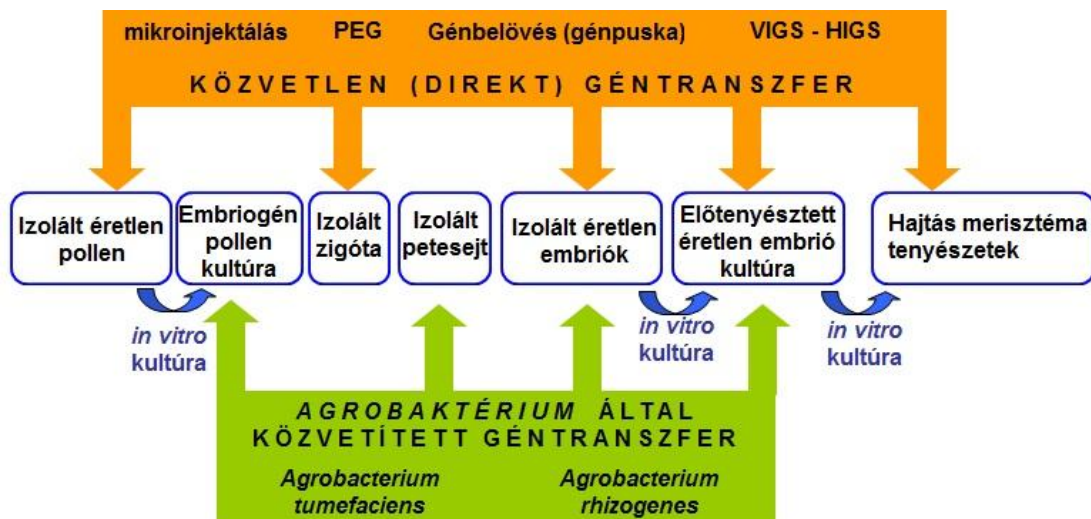
közvetett és *közvetlen* eljárásokra csoportosíthatók. A közvetett módszer azokat a géntranszfer technikákat foglalja magába, melyekben az ember más élő (vírus, baktérium) szervezetet használ fel a transzgén átvitelére a növényi sejtbe és beépítésére a sejtmag DNS-be. A közvetlen géntranszfer technikák során a transzgént azonban mi magunk juttatjuk be a célszövet sejtjeibe, változatos módszereket alkalmazva (vákummal, részecskebelövással, protoplasztok PEG kezelésével, elektroporációval, elektroforézissel, mikro- és makroinjektálással, pollentömlő kezeléssel, lézerrel stb) (3. ábra). A kultúrnövényeken leggyakrabban azonban csak két transzformációs technikát alkalmaznak, az Agrobaktériumra alapuló közvetett és a részecskebombázást alkalmazó közvetlen géntranszfert.

A kezdeti transzformációs kísérletek mind a közvetlen génbeviteli eljárásokat részesítették előnyben. A gabonaféléken transziens expressziós kísérletekben számos módszerrel és növényi szövet alkalmazásával mutattak ki sikeres géntranszfert, például szuszpenziós sejtek mikroinjektálásával (Mendel et al. 1989); éretlen embriók és kallusz tenyészetek (Kantha et al. 1989), vagy fejlődő endospermium (Knudsen és Müller 1991) bioliztikus transzformációjával, mikropóra (Kuhlmann et al. 1991), és aleuron (Lee et al. 1989) vagy mezofill (Junker et al. 1987), protoplasztok polietilén-glikol (PEG) mediált géntranszfer technológiájával.

Az 1990-es évek elején egyszikűeken végzett korai stabil transzformációs kísérletek közül sokáig a protoplaszt-technika ígérkezett a leghatékonyabb módszernek. A gabonaféléken végzett protoplaszt transzformációs kutatások közül az első közvetlen génbeviteli technika a már említett, PEG mediált módszerrel indukált DNS-felvétel volt. A polietilén-glikol kitágította a protoplasztok pórusait, a transzformációs oldatba adagolt DNS pedig a sejthártya pórusain át bejutott az izolált sejtfal nélküli sejtekbe. Az első sikeres árpa transzformációról szóló irodalmi beszámolók is a PEG által közvetített génbeviteli módszert alkalmazták (Lazzeri et al. 1991). Bár a PEG-indukált DNS-felvétel az átvitt gének stabil expresszióját eredményezte a sejt kultúrákban, stabil transzformáns növényt azonban nem sikerült a sejtvonalakból regenerálniuk. Később, Funatsuki et al. (1995) szintén PEG által közvetített protoplaszt transzformációs módszert alkalmazva már stabil transzformáns árpa növények regenerálásáig is eljutott, és a növények az utódgenerációba is átörökítették a transzformáció bizonyítására használt neomycin-foszfotranszferáz (*NPTII*) szelekciós markergént. Salmenkallio-Marttila et al. (1995) mikropóra eredetű protoplasztokon elektroporáció segítségével végzett DNS-felvételt alkalmazott, majd Southern-blot analízissel nemcsak a transzgén genomi integrációját, de utódgenerációba történő örökítését is igazolták. Éretlen embrió eredetű kallusz tenyészetből indított sikeres PEG-indukált protoplaszt transzformálásról is beszámoltak (Kihara et al. 1998), de az éretlen árpa embrió szkutellumából indított protoplaszt-tenyészeteket is eredményesen használták stabil transzformáns árpavonalak előállítására (Nobre et al. 2000) (3. ábra). Az ezredfordulót követően

zigóta eredetű protoplaszt kultúrák mikroinjektálását ismertették (Holm et al. 2000), azonban a transzgén stabil expressziója nem volt megfigyelhető.

A vírus indukált géncsendesítés (VIGS) napjaink egyik legígéretesebb módszere a funkcionális génanalízisnek. Ebben az esetben a géncsendesítést a növényi sejtben replikálódó vírusok indukálják saját RNS genomjukkal szemben. Ha a vírus genomja idegen szekvencia elemet is tartalmaz (amely homológ egy növényi endogén génnel), akkor az endogén gén mRNS-e is szekvencia specifikusan lebomlik és így az endogén gén hiányára jellemző fenotípus alakul ki a növényen. Mind a rozsok mozaik vírusát (BMV), mind pedig az árpa csíkos mozaik vírusát (BSMV) sikerrel alkalmazták rizs, árpa és kukorica növények vírus indukált géncsendesítésére. BSMV alkalmazásával a célgén teljes elhallgattatását érték el, azonban ez csak a növény egy bizonyos részére korlátozódott, és csak tranziens géncsendesítés valósult meg (Ding et al. 2006; Holzberg et al. 2002; Oikawa et al. 2007). Újabban patogén rezisztenciában szerepet játszó gének elhallgattatására is sikerrel alkalmazzák (Bruun-Rasmussen et al. 2007; Yuan et al. 2011) ezt az eljárást. Ezzel a rendszerrel analóg, az ún. gazdaszervezet indukált géncsendesítés (host induced gene silencing, HIGS), amely új lehetőséget biztosít a különböző virulencia génjelöltek funkcióvesztéses genotípusainak vizsgálatához. E rendszerben a gombafertőzés indukálja az RNS-csendesítést, ami végül a fungális RNS lebontásához vezet. A módszert sikerrel alkalmazták különböző génjelölteknek az árpa lisztharman (*Blumeria graminis*) fertőzésben betöltött szerepének igazolására (Nowara et al. 2010; Pliego et al. 2013).



3. ábra: Közvetlen és *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített géntranszfer technológiák csoportosítása az alkalmazásukhoz használt leggyakoribb kiindulási árpa szövettenyészetek felsorolásán bemutatva (Az eredeti ábra forrása: Kumlehn és Hensel 2009)

Az előzőekben bemutatott közvetlen génátviteli módszerek, pl. a protoplasztokba történő DNS-bejuttatás mégsem váltak igazán elterjedt módszerré, a protoplasztokból történő

növényregenerálás nehézségei miatt. Így – más egyszikűekhez hasonlóan – leginkább az ún. biolisztikus módszer terjedt el (lásd következő alfejezet). Ennek során a DNS-t olyan szövetekbe juttatják be, melyekből lényegesen egyszerűbb a regeneráció.

2.4.1. Az árpa biolisztikus elven alapuló közvetlen genetikai transzformációja

A részecskebelövés elvén alapuló közvetlen géntranszferrel kapcsolatos első közlemények az 1980-as évek második felében jelentek meg, s ettől kezdve az egyik legelterjedtebb és bizonyos növényfajok esetében a leghatékonyabb és egyedülként használható transzformációs módszerré vált. A gének mesterséges bejuttatására módszertani szempontból nagy jelentőségű volt a Cornell Egyetemen kifejlesztett részecskebelövő berendezés, közismertebb nevén génpuska (Sanford 1988). Hazánkban Jenes Barnabás és munkatársai a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központban (Gödöllő) fejlesztettek ki egy nitrogéngázzal működő génpuskát (Genebooster) (Jenes et al. 1996; 1997). Mindkét eszköz használatának lényege, hogy a kiválasztott gén izolált cDNS-ét hordozó mikrolövedékekre szélesztik (arany vagy wolfram részecskékre) és 50 bar nyomásértékű gáz és -0,7 bar vákuum egyidejű alkalmazása mellett nagy sebességre felgyorsítják. Ennek segítségével a részecskék áthatolnak a sejtfalon és a sejtmembránon, magukkal szállítva a sejtek belsejébe az idegen DNS-szakaszokat. A sejtek egy része túléli az így okozott sérülést, a belőtt izolált DNS integrálódik a célsejt genomjába, majd osztódik és ezekből a sejtekből megfelelő szelekciós körülmények között növények regenerálhatók (Pepó 2010).

Az első stabil, biolisztikus árpa transzformációs eredményeket felmutató közlemény 1993-ból származik. Ritala et al. (1993) a *Hordeum vulgare* cv. "Pokko" árpafajta embriótenyészetéből indított sejtszuspenziót transzformálta a génelövés módszerét alkalmazva, utat nyitva a későbbi embrió-, portok- és mikrospóra-eredetű sejttenyészetek biolisztikus transzformációjához. Későbbi közleményükben (Ritala et al. 1994) már éretlen embriók részecskebelövéséről számoltak be a "Kymppi" finn fajtát alkalmazva. Wan és Lemaux (1994) a "Golden Promise" tavaszi árpafajta éretlen zigotikus embrió, fiatal kallusz és mikrospóra eredetű embrió tenyészetek génelövési eredményeit közölte. Közleményük volt az első, mely a "Golden Promise" tavaszi árpafajta sikeres stabil genetikai transzformálásáról számolt be. Hasonló, éretlen embriókon végzett kísérleteket más szakirodalmakban is publikáltak: a "Galena", "Harrington" (Cho et al. 1998), valamint a "Golden Promise" (Cho et al. 1998; Harwood et al. 2000) tavaszi árpafajta esetében, de az "Igrí" fajta izolált mikrospóra tenyészetének androgenézis indukciójával (Jaehne et al. 1994), a "Harrington" fajta

hajtásmerisztéma (Zhang et al. 1999) tenyésztéseinek génbelövéséből és a "Conlon" fajta éretlen embrióiból indított kallusz tenyészetek (Manoharan és Dahleen 2002) génbelövéséből is származtak eredményes transzformációk. A részecskebelövésen alapuló transzformációs technológia bár stabil transzformációs eredményeket mutatott fel, hatékonysága igen változó határok között mozgott: az idézett irodalmi publikációkban 0,3-7,9 % között (regenerált növény/izolált embriók aránya) változó transzformációs hatékonyságról számoltak be. Az akkoriban leghatékonyabb transzformációs módszer (Wan és Lemaux 1994) eredményeinél magasabb hatékonyságot azóta sem sikerült génbelövésre alapozott transzformációs módszerrel elérni. A bioliztikus transzformációs módszert az utóbbi évtizedben is több kutatócsoport használta stabil transzformáns árpavonalak előállítására (Mrízová et al. 2014).

Az eddig elért eredmények bebizonyították, hogy a bioliztikus transzformáció az árpafajták széles körében is sikeresen alkalmazható, szemben az *Agrobacterium tumefaciens* használatára alapuló módszerrel, ahol a transzformáció sikere nagymértékben függ a felhasznált genotípustól.

2.4.2. Az árpa *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített genetikai transzformációja

Az Agrobaktérium fajok a *Rhizobiaceae* családba tartozó talajlakó, növénypatogén baktériumok. Az *Agrobacterium* alcsalád két legismertebb tagja a növények szárán tumort képező *Agrobacterium tumefaciens* és a hajszálgöyököséget okozó *Agrobacterium rhizogenes*. Gazdakörük rendkívül szélesnek tekinthető, a legtöbb kétszikű fajt képesek fertőzni. Éppen ezért közismert tény, hogy a talajlakó baktériumok által közvetített génbevitel az egyszikű fajoknál hosszú évekig nem jöhetett számításba, az egyszikűekre történő használatuk gyakorlatilag alkalmatlannak bizonyult. Az Agrobaktérium-közvetített géntranszfer technikák számos előnnyel szolgáltak a részecske belövéses közvetlen géntranszfer technikákhoz viszonyítva, ideértve a jobb- és bal-oldali határszekvenciák közötti meghatározott transzgén integrációt is, melynek következtében alacsony a transzgén átrendeződésének lehetősége. Az idegen gén beépülése általában kis kópiaszámban és az átíródás szempontjából aktív régiókba történik, ezáltal magas szintű génexpresszió érhető el (Koncz et al. 1989).

Hiei et al. (1994) rizsben elért eredményei (stabil transzformáns vonalak előállítása *Agrobacterium* felhasználásával) ugrásszerű módszertani változást hoztak az egyszikű növényfajok génbeviteli technikájában. Az első sikeres *Agrobacterium* által közvetített, stabil árpa transzformációról Tingay et al. (1997) számolt be, akik az *Agrobacterium* módszert, melynek során 'Golden Promise' árpafajta éretlen embrióinak és a baktérium tenyészet ko-

kultivációját alkalmazták. A ma alkalmazott eljárások szemszögéből nézve, ennek a módszernek a sikere számos tényező összehangolt, együttes alkalmazásának, optimalizálásának volt köszönhető. A fontosabb összetevők, például a hipervirulens AGL-1 *Agrobacterium* törzs és a megfelelő bináris vektor együttes használata, az *Agrobacterium*-szuszpenzió antibiotikum hozzáadását nélkülöző növesztési körülményei, az izolált embriók embriópajzsának mikroszkópos eltávolítása, s az izolált szkutellumok táptalajon történő elhelyezésének módja (az embriópajzs alapi részén érintkezik a tápközeggel) voltak. Később Matthews et al. (2001) az éretlen embriók kallusz-indukciós táptalajon történő előkezelését elhagyva, egyszerűsítette a módszert. Trifonova et al. (2001) pedig különböző tényezők hatását vizsgálta a transzformáció hatékonyságára: például a növekedési regulátorok használatát, ozmotikus kezelést, sebzés és sebzési felületen keresztül a baktérium általi növényi sejtek fertőzését segítő acetosziringon-kezelés szerepét. Igazolta, hogy a 2,4-D helyett a táptalajhoz adagolt 3,6-diklór-2-metoxibenzoésav (dikamba) kezelés jelentősen megnövelte a stabil transzformációk gyakoriságát, továbbá, hogy az éretlen embriók két napos (a korábbi egy nap helyett) kallusz-indukciós táptalajon való előtenyésztése acetosziringon kezeléssel együttesen is növelte a hatékonyságot.

Az alkalmazott árpa genotípusnak az *Agrobacterium*-közvetített transzformációra gyakorolt hatékonyságáról számos közleményben is beszámoltak (összefoglalók: Goedeke et al. 2007; Hensel et al. 2008). Ezek alapján a legnagyobb transzformációs hatékonyságot, legtöbb stabil transzgenikus árpa vonalat a hipervirulens LBA4404 *Agrobacterium* törzs (Hensel et al. 2008) és a "Golden Promise" árpafajta éretlen embrióinak használatával érték el (Trifonova et al. 2001; Hensel et al. 2008; Éva et al. 2008). Jelenleg is ezt a transzformációs eljárást alkalmazzák leggyakrabban a stabil transzformáns árpa vonalak előállítására (Harwood et al. 2012; Shrawat és Good 2011; Yadav et al. 2012; Kapusi et al. 2013; Soltész et al. 2013).

2.5. Abiotikus stresszrezisztencia kialakítására irányuló biotechnológiai törekvések

Nemcsak világban, hanem hazánkban is a becslések szerint a terméshozam csökkenésének mintegy 70 % -át az abiotikus stresszhatásoknak tulajdonítható hozamkiesések adták (Acquaah 2007). Az éghajlatváltozásnak tulajdonítható szárazság és magasabb átlaghőmérséklet további kockázatot jelentenek az élelmiszert előállító agrártevékenység számára, jelentős kiesést okozva a legfontosabb gabonafajták – úgy, mint a búza, kukorica és árpa – terméshozamában (Lobell és Field 2007), így az igény a környezeti szárazság és sótűrő gabonafélék előállítására az utóbbi évtizedekben jelentősen megnövekedett (Reynolds és Ortiz 2010).

A molekuláris biológiai ismeretek, a rekombináns-DNS technológiát alkalmazó génszűrés új lehetőségeket nyitottak a gazdasági növények nemesítésében. A géntechnológiára alapozott megoldások a növény-nemesítés fordított (reverz) módszerei, itt ugyanis már a genotípus a kiindulás és annak tudatos átformálásával állítja elő a kívánt fenotípust. A ma ismert transzgenikus növények mindössze néhány genetikai elemben térnek el a kiinduló genotípustól. Az ezek által kódolt új tulajdonságoknak azonban komoly termesztéstechnológiai, kereskedelmi vagy ipari értékük van (Khachatourians et al. 2002).

A környezeti abiotikus és biotikus stressz hatások közös jellemzője, hogy mire a kártétel jelentkezik, a hatékony védekezésre és a károk csökkentésére már kevés a lehetőség, éppen ezért az ilyen típusú kockázati tényezők megelőzése szintén a nemesítők feladata.

A vízhiány körülményei között aktiválódott védekezési folyamatok felhasználásával számos géntechnológiai stratégia kísérletes kipróbálására került sor, melyeket röviden az alábbi alfejezetekben foglalok össze.

2.5.1. A sejtstruktúra megőrzését szolgáló fehérjék alkalmazása

A késői fejlődési stádiumú embriókban nagy mennyiségben előforduló ún. LEA fehérjék génjeiről kiderült, hogy víz stressz esetén a vegetatív növényi szövetekben is akkumulálódnak (összefoglalóként lásd Bartels et al. 2007) (4. ábra). Különböző típusai közül a 3. és 5. csoport fehérjéire egy jellegzetes aminosav-motívum ismétlődése jellemző, és a kialakuló fehérjeszerkezet ionok megkötését teszi lehetővé. Ebbe a csoportba tartozik az árpa aleuron rétegében felhalmozódó HVA1 (*Hordum vulgare* L. aleuron1) fehérje. A *HvA1* gén a vízvesztés stádiumában lévő embrióban aktív, de csíranövényben abszcizinsav (ABA) kezelés, sóstressz és dehidratáció hatására is működésbe lép. Konstitutív expressziót biztosító aktin promóterrel rizs transzformációhoz felhasználva vizsgálták a transzformált növények stressz toleranciájának meghatározásához (Xu et al. 1996), s a mért növekedési paraméterek (levélnövedési ráta, növénymagasság, gyökérsúly) alapján a transzformált növények megnövekedett toleranciát mutattak vízmegvonásos körülmények között és só stresszel szemben, a levelek sárgulása, nekrotikus elhalások a fiatal leveleken, mint a károsodás tünetei egyaránt később jelentek meg a transzformált növényeken. A gén túltermeltetése egy újabb tanulmány szerint azt mutatta, hogy a transzformált növények szignifikánsan magasabb relatív víztartalommal és magasabb turgor nyomással rendelkeztek, azonban a *HVA1* gén terméke nem mint kompatibilis ozmolit játszott szerepet a védekezési mechanizmusokban, hanem a megnövekedett tolerancia alapját a sejtmembránok megnövekedett stabilitása adta (Chandra Babu et al. 2004). Hasonlóan,

transzgenikus szeder (*Morus indica*) növényeken végzett kísérletek is a vad típusú kontroll növényekhez képest egyaránt jobb sejtmembrán stabilitást és a kettes fotokémiai rendszer jobb effektív kvantumhatékonyságát (ΦPSII) eredményezte, valamint kevesebb fotooxidatív károsodás volt megfigyelhető (Lal et al. 2008).

A LEA-fehérjék másik csoportjába a *vízkötési képességekkel* rendelkező fehérjék tartoznak, melyek töltéssel rendelkező aminosavakban és glicinben gazdagok. Ezek közül külön figyelmet érdemelnek az *aquaporinok* (vízcsatorna fehérjék, 4. ábra), melyek nagy hatékonysággal és szelektivitással képesek vizet, vagy más oldott anyagokat, ionokat apoplasztikus útvonalon transzportálni a membránok között (Cui et al. 2008; Jang et al. 2007; Zhang et al. 2008). Működésüket hormonok (ABA, gibberellin), vízstressz, vagy akár patogénfertőzés is befolyásolhatja (Parent et al. 2009).

2.5.2. Ozmotikus védelmet biztosító vegyületek (ozmolitok) szintetizáltatása

Régóta ismert, hogy a vízhiány befolyásolja a növényi sejtek metabolizmusát (Hsiao, 1973), azonban sokáig nem volt tisztázott, hogy a megváltozott anyagcsere folyamatok mely részének van szerepe a stresszhez történő adaptálódásban, és mely része jött létre közvetlenül a stresszhatás következtében. A vízhiány esetén a sejtek víztartalmának elvesztésével csökken a vízfelvételt lehetővé tevő ozmotikus érték. Ezt a vízfelvételi folyamatot segítik elő az ozmolitok, melyeknek elsődleges feladata a turgor és a makromolekulákat körülvevő hidrát burkok fenntartása. A *kompatibilis ozmolitok* – azaz a biokémiai folyamatokat nem, vagy azokat előnyösen befolyásoló ozmolitok – hidrofil molekulák; a fehérjék és fehérje komplexek felszínén a vízmolekulákat így helyettesíteni tudják, ezáltal ozmoprotektánsként és kis molekulatömeg chaperonként hathatnak (Diamant et al. 2001; McNeil et al. 1999), csökkenteni képesek a toxikus ionok enzimaktivitást gátló hatását (Brown 1990), megnövelik az enzimek hőstabilitását; mellyel közvetve gátolják az enzim-komplexek szétesését (Galinski 1993; Papageorgiou és Murata 1995) (4. ábra). Egyes irodalmi adatok alapján az ozmolitoknak fontos szerepe van a reaktív oxigén zármazékok (reactive oxygen species, ROS) hatástalanításában és a szabadgyökök eltávolításában (Szabados és Savouré 2010; Bolouri-Moghaddam et al. 2010; Gill és Tuteja 2010). Az ozmolitok szerkezetük alapján lehetnek aminosavak (prolin), gyűrűs-poliolok (mannitol), kvaterner ammónium származékok (betainok), terciér szulfónium-származékok és cukrok (trehalóz, szacharóz). Ezen ozmolitok felhalmozása a belső ozmotikus potenciál csökkentésével hozzájárul az élőlények stressz toleranciájának javításához (Delauney és Verma 1993; Cominelli és Tonelli 2010), szintézisük a természetes védekezési folyamatok részét

képezi, azonban a növények egy része természetes körülmények között nem képes előállítani őket. A géntechnológia a fent felsorolt ozmolitokra alapozott stressz ellenállóságot fejlesztett ki, s ezzel kiterjesztette az ozmolitok szintézisére képes gazdasági növények körét is.

Az egyik legszélesebb körben vizsgált kompatibilis ozmolit a *prolin*, az ozmotikus stressz során történő felhalmozódása számos közlemény vizsgálatának alapját jelentette, s ezek eredményeként a kutatók a prolin bioszintézisében szerepet játszó kulcsenzimek kódoló génjeit felhasználva próbálták stressz tűrő transzformáns növényeket létrehozni. Mind a 1-pirrolin-5-karboxilát-szintáz (*P5CS*), mind pedig a reduktáz enzimek (*P5CR*) génjeit klónozták már növényekből. A prolin többirányú hatását tekintve kézenfekvő, hogy a *P5CS* gén túltermeléséből, valamint a prolin szint megemelkedéséből megnövekedett stressz rezisztenciát várjunk. Cvikrová és munkatársai (2013) a *P5CS* (F129A) gént túltermelő dohány transzformánsokat állítottak elő, s igazolták a szárazság és hő stressz prolin szint növekedésére gyakorolt hatását, s lipid-peroxidációs termékek koncentrációjának mérésével bizonyították a túltermelő transzformáns növények megnövekedett stressz ellenállóságát.

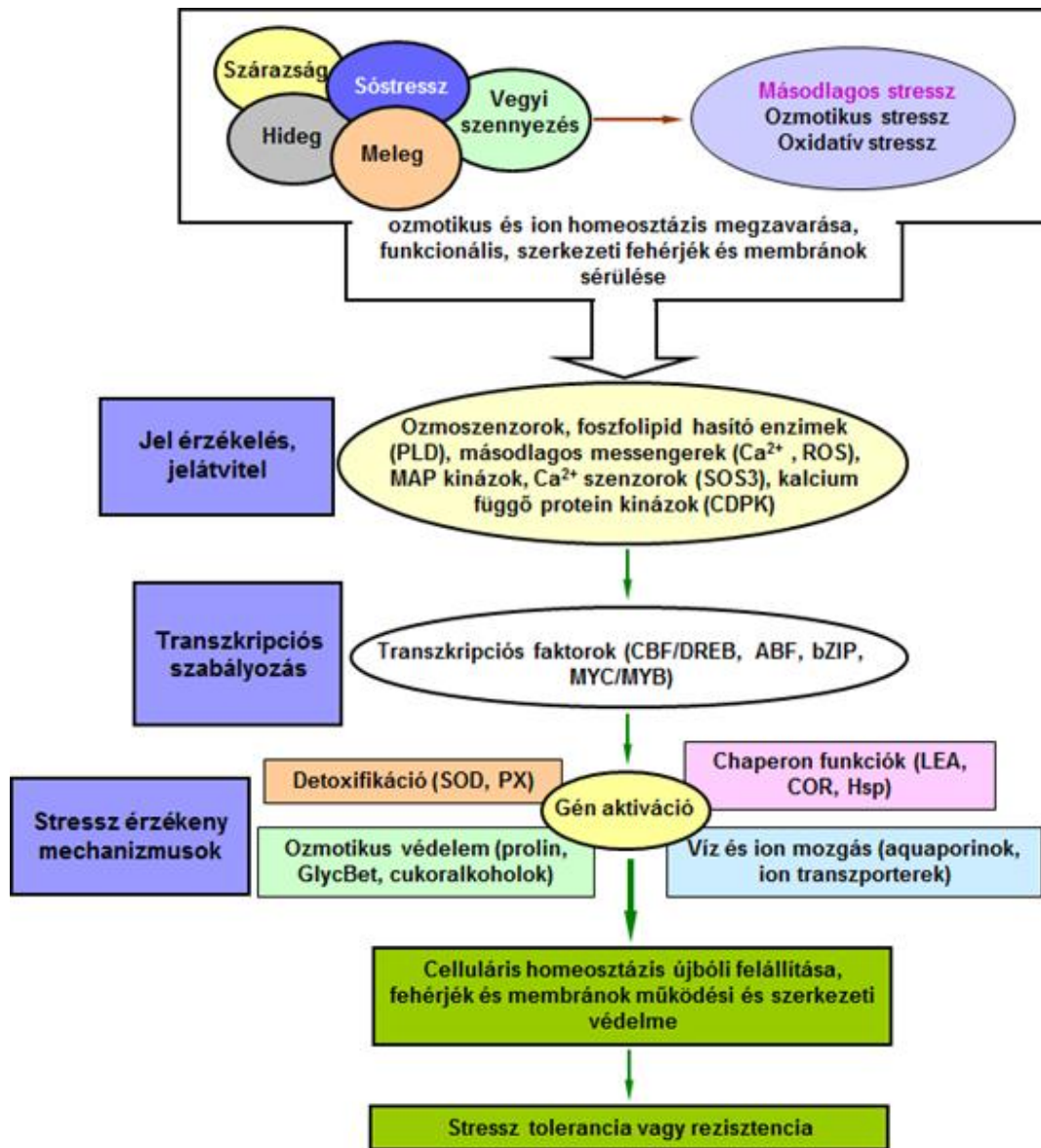
2.5.3. A vízhiányt kísérő jelátviteli és génexpressziós szabályozó elemek (transzkripciós faktorok) felhasználása

A transzkripciós faktorok (TF) a génszabályozás alapvető résztvevői, minden élőlényben megtalálhatóak. Eukariótákban az ún. „általános transzkripciós faktorok” a transzkripció létrejöttéhez szükséges pre-iniciációs komplex kialakításában vesznek részt. Egyes transzkripciós faktorokban (ilyenek például a TFIIA, TFIIB, TFIID faktorok) olyan funkcionális motívumok találhatóak, melyek nem feltétlenül a szabályozott gén DNS-éhez kötődnek, hanem a RNS polimerázzal kerülnek direkt kapcsolatba. Más TF-ok a differenciális génexpressziót teszik lehetővé. Ezek a faktorok szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérjék, melyek a gének transzkripcióját szabályozzák. A célgén promóteréhez kötődve aktiválják, vagy éppen gátolják a gén átírását. Kiemelkedő szerepük van a génszabályozásban: biztosítják egy adott gén szövet-, fejlődés-, vagy stimulus-specifikus expresszióját (Goodrich és Tjian 2006). A DNS-kötő domén aminosavai lépnek kapcsolatba a szabályozott gén promóterének bázisaival, e domén szekvenciája, struktúrája tehát alapvetően meghatározza, hogy az adott TF mely gén/gének szabályozására képes.

A TF-ok mintegy fele növény-specifikus, azaz olyan DNS kötő domént tartalmaz, mely csak növényekből ismert (Riechmann et al. 2000); a TF-okat ezek alapján soroljuk családokba. Az egy bizonyos típusú TF által szabályozott gének csoportját regulonnak nevezzük. A

növényekben az abiotikus stresszválaszban betöltött szerepük alapján legalább négy különböző regulont azonosítottak, ezek: (1) a C-ismétlődést kötő elem/Dehidratációra válaszoló kötő (CBF/DREB1) regulon; (2) a nitrogén asszimiláció kontroll, cink-ujj homodomén (NAC és ZF-HD regulon); (3) az ABA-függő elemek-kötő fehérje/ABA kötő elem (AREB/ABF) regulon; (4) és a myelocytomatosis oncogene (MYC)/myeloblastosis oncogene (MYB) regulon (Saibo et al. 2009) (4. ábra). Az első két regulon az ABA-független, a második kettő az ABA-függő jelátviteli úthoz tartozik. Ezen transzkripciós faktoroknak a növényi transzformációhoz történő felhasználása stressz toleráns genotípusokat eredményezhet, irodalmi adatok alapján ígéretes példának tűnhet például a CBF/ DREB TF-okat kódoló génekkel történő transzformálás. Ezeket a TF-okat sikeresen használták számos növényfaj stressz toleranciájának javítására, úgymint a barna mustár (Cong et al. 2008), rizs (Oh et al. 2007), szója (Chen et al. 2007) és néhány pázsitfű esetében (Zhao et al. 2007). Az utóbbi időben búzából izolált két CBF / DREB TF-t használtak árpa és búza stressz toleranciájának fokozására (Morran et al. 2011). A DREB2 és a DREB3 TF-okat kódoló géneket a konstitutív expressziót biztosító dupla CaMV35S promóterrel, valamint a szárazság-indukálható kukorica ZmRAB17 promóterrel meghajtva transzformálták, mely után mindkét vektorkonstrukciót hordozó transzformánsok szárazság-, só- és hidegellenállóságot mutattak, azonban a túltermelő transzformáns vonalak komoly növekedési zavarral rendelkeztek. A stressz függő szintézis viszont nem okozott fenotípusos változást a növényekben. Az említett példa is kihangsúlyozza, hogy a transzgenek kifejeztetésének finom szabályozottsága mennyire szem előtt tartandó szempont a biotechnológiai nemesítés során.

A lúdfű Y sejtmagi faktor családba tartozó AtNF-YB1 (*Arabidopsis thaliana* nuclear transcription factor Y subunit B-1) TF túltermeltetése a szárazságtűrés kialakításáért felelős gének bekapcsolásával képes csökkenteni a vízmegvonás káros hatását ebben a modellnövényben. A kukorica ortológ (ZmNF-YB2) megtalálása és túltermeltetése kukoricában hasonló fenotípust eredményezett. Kétéves szabadföldi összehasonlító teszttel kukoricában stabil, 10%-ot meghaladó termésnövekedést értek el a TF magas szinten történő termeltetésével, akár a jó termést biztosító második, akár az aszályos első év hozamát tekintjük (Nelson et al. 2007).



4. ábra: Az abiotikus stresszhatásokra adott növényi válaszreakciók sokrétűsége. (Az eredeti ábra forrása: Vinocur és Altman 2005).

2.5.4. Károsító molekulák hatástalanítását biztosító mechanizmusok javítására irányuló törekvések

A biotikus és abiotikus stresszhatások egyik közös jellemzője, hogy a sejtekben reaktív oxigén származékok (ROS) keletkezéséhez és toxikus reakciótermékek (reaktív karbonilok) felhalmozódásához vezetnek (Moran et al. 1994; Price et al. 1989), melyek tovább fokozzák a stresszhatás következtében kialakult sejtkárosodást. Az oxidatív stressz számos ROS felhalmozódásához vezet a mitokondriumban, a peroxiszómákban és kloroplasztisban, amely a membránlipidek, fehérjék és nukleinsavak oxidatív károsításán keresztül befolyásolhatja az anyagcsere utak természetes lefolyását (Apel és Hirt 2004; Foyer és Noctor 2005; Turkan és Demiral 2009). ROS-ek azonban egyéb folyamatok eredményeképpen, katalitikus módon is

keletkeznek a növényi sejt több más részében is, mint például az endoplazmatikus retikulumban, a citoplazmában és az apoplastban is (Mittler 2002; Apel és Hirt 2004; Gill és Tuteja 2010), amelyeknek szerepe lehet a stresszválaszhoz fűződő jelátviteli útvonalak indukálásában. A ROS-ek sejten belüli koncentrációját egy többkomponensű antioxidáns rendszer szabályozza, melynek *enzimatis* és *nem enzimatis antioxidáns* elemei különíthetők el. Számos irodalomban közöltek adatokat az antioxidáns enzimek expressziójában és aktivitásában megnyilvánuló különbségekre vonatkozóan, mely eltérések összefüggésben voltak a vizsgált genotípusok stressztűrésének mértékével (Munns és Tester 2008). Ezen enzimaktivitások mérése a stressztolerancia jellemzésének egyik lehetséges módja lehet. A szuperoxidgyök elleni védelem első vonalát a szuperoxid-dizmutáz (SOD) metalloenzimek családja alkotja (Alscher et al. 2002). Közreműködésükkel a szuperoxid-gyökből H_2O_2 és O_2 képződik (Parida és Das 2005). A H_2O_2 felhalmozódása a fehérjék károsodásához, lipid-peroxidációs folyamatok kialakulásához vezet, s keletkezési helyétől függően más-más enzimatis útvonalon keresztül kerülhet sor a semlegesítésére. A kloroplasztisban az aszkorbát-peroxidáz (APX) enzimek játszó a fő szerepet a H_2O_2 vízzé történő hatékony redukciójában (Noctor és Foyer 1998), a katalázoknak (CAT) pedig a peroxisómákban és glioxisómákban képződő H_2O_2 semlegesítésében van meghatározó szerepük. A glutation-peroxidázok (GPX) pedig a H_2O_2 mellett lipid hidroperoxidok redukcióját is katalizálhatják, és a sejten belül több helyen; a kloroplasztisban, mitokondriumban és a citoplazmában is megtalálhatóak. Az enzimatis antioxidáns rendszer megnövekedett aktivitásáról számoltak be sokféle növényfaj kiváló sótoleranciával rendelkező genotpusai esetén, például búza (Zhong et al. 2010; Bhutta 2011), árpa (Jin et al. 2009), paradicsom (Dogan et al. 2010) és kukorica (Kholova et al. 2010) esetében, valamint antioxidáns géneket fokozottan expresszó transzgenikus növényekben (Van Camp et al. 1994; Foyer et al. 1994; Polidoros és Scandalios 1999; Xu et al. 2008).

A toxikus vegyületek kémiai átalakításában, s ezáltal károsító hatásaik megszüntetésében szerepet játszó enzimek (Srivastava et al. 1995; 1999; Vander Jagt et al. 1992) az aldo-keto reduktáz enzimcsaládba (AKR) tartoznak. Szerkezeti szempontból az enzimcsalád tagjairól elmondható, hogy monomer, körülbelül 320 aminosav hosszúságú, ún. $(\alpha\text{-}\beta)_8$ "barell" struktúrával rendelkező, széles szubsztrát-specifitással jellemezhető enzimek; melyek sokféle aldehid szubsztrátot képesek a megfelelő alkohollá redukálni nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát [NADPH] koenzim jelenlétében és nem rendelkeznek az annak megkötésében szerepet játszó Rossmann-motívummal. Az AKR családot főként aldehid-reduktázok, aldóz-reduktázok és hidroxiszteroid-dehidrogenázok alkotják.

Az AKR enzimcsalád egyik klasszikus tagját, az aldóz-reduktázt (AR), a poliol anyagcsere út első enzimeként azonosították, amely a D-glükóz szorbitollá történő redukcióját

katalizálja. A humán aldóz-reduktáz enzim a cukorbetegséggel kapcsolatos szövödmények kialakulásáért tehető felelőssé, a betegség során kialakuló hiperglikémia következtében, a glükóz aldóz-reduktáz által katalizált redukciója a sejten belüli szorbitol szint jelentős emelkedését eredményezi, hiszen a szorbitol→D-fruktóz átalakulás nem képes lépést tartani a szorbitol képződés mértékével (Chang et al. 2007). A glükóz átalakító képessége miatt az aldóz-reduktáz enzimek számos szövet-specifikus metabolikus útvonalban is szerepet játszanak (Srivastava et al. 2005). A kutatások eredményei szerint a *Saccharomyces cerevisiae* hármas AKR null-mutánsok hősokk-kal szemben kiemelkedő érzékenységet mutattak, mely a humán aldóz- reduktáz gén (*Homo sapiens* Aldo-keto reductase family 1 member B1, *HsAKR1B1*) heterológ expressziójával jelentős mértékben mérsékelhető volt. Számos irodalmi adat ezen enzimek stressz elleni védelemben betöltött szerepének redundáns voltáról számolt be, és bemutatta, hogy néhány élesztő és humán AKR enzim hasonló fiziológiai szereppel rendelkezhet (Chang et al. 2003; 2007).

A növényi szakirodalomból szintén jól ismert az aldóz-reduktázoknak a lipid-peroxidációból származó reaktív aldehidek detoxifikálásában betöltött szerepe (Hideg et al. 2003; Mundree et al. 2000; Oberschall et al. 2000). Az árpa aldóz- reduktáz gén által kódolt fehérje az egyik legjobban jellemzett egyszikű növényi enzim, transzkriptumának és a transzlálódó fehérjének az akkumulációja az árpa szárazságtűrésének kialakulásával párhuzamosan nő és a szárazságtűrő embrióban éri el maximumát (Roncarati 1995). Bizonyított a mag kiszáradásakor betöltött ozmoprotektív szerepe (Bartels et al. 1991), valamint a különböző xenobiotikus aldehideket méregtelenítő funkciója (Kolb et al. 1994; Colrat et al. 1999). Nemrég, egy *AKR4C9* (*At2g37770*) névvel illetett AKR gént azonosítottak az *Arabidopsis thaliana*-ban (Simpson et al. 2009) és kimutatták, hogy a rekombináns fehérje szubsztátjai között szerepel az egyik fő lipid-peroxidációs termék, a malondialdehid (MDA) is. A lucerna (*Medicago sativa*) AKR-t (*MsALR*) túltermelő dohánynövényeknél is magasabb fokú rezisztenciát tapasztaltak a metilviologén (MV), nehézfémek, UV-B sugárzás által indukált oxidatív károsodással szemben, mint a vad típusú növényeknél (Oberschall et al. 2000; Hideg et al. 2003; Hegedűs et al. 2004).

Az évtizedekre visszanyúló együttműködés az SZBK és a Gabonakutató Non-Profit Kft. kutatói között lehetővé tette az *MsALR* gént kifejező búzanövények létrehozását és azok vizsgálatát közösen kialakított és folyamatosan fejlesztett stresszdiagnosztikai rendszerben. A stabil transzformánsokon végzett vizsgálatok igazolták azt, hogy a vízmegvonásnak kitett növények esetében a növényenkénti szemtömeg jelentősen több a kontroll növények értékénél (Fehér-Juhász et al. 2014).

A genomszekvenálások eredményének publikálása, e szekvenciák megjelenése a kereshető adatbázisokban felgyorsította a lucerna *MsALR* enzim rizs ortológjának azonosítását és

klónozását. A biokémiai analízis a rizs és lucerna enzimek nagyfokú hasonlóságát mutatta a szubsztrátok kiválasztásában és a redukciójuk sebességében. A rizs aldóz reduktáz esetében sikerült bizonyítani először, hogy szubsztrátként elfogadja és hatékonyan redukálni képes mind a lipidperoxidációból származó malondialdehid, mind a glikolitikus metilglioxál (MG) vegyületeket. A külsőleg adott MG-lal szembeni ellenálló képességet jól mutatta a transzformáns dohánynövények jobb növekedése e körülmények között (Turóczy et al. 2011).

2.6. A növényi stressz tolerancia mérésének lehetőségei

Az abiotikus stressz toleranciára történő nemesítést sokban nehezíti, hogy a genetikai variánsok, az alkalmazott fenotípusok jellemzése sem stresszmentes, sem pedig stresszelt körülmények között sem egyszerű. Így például tekintettel kell lenni a stresszelt növények válaszreakcióinak fázisaira, hiszen a növényfejlődés különböző fázisaiban a stressz tolerancia megnyilvánulása is eltérő mechanizmusok eredményeképpen alakul ki, továbbá a különböző korú növények is eltérő válaszreakciókat mutathatnak. Sokszor nem szabad elfeledkezni arról sem, hogy természetes körülmények között az egyes stressz hatások (pl. szárazság) valamely más stressz hatással egészülnek ki (pl. hőstressz, sóstressz), melyek szintén befolyásolják a stressz tolerancia fokának meghatározására irányuló módszerek alkalmazási lehetőségeit. A növényi stresszválasz leküzdésében a védekezési mechanizmusoknak is számos fajtája nyilvánulhat meg. A környezeti abiotikus stresszorok növényekre gyakorolt hatásainak megismerése és a stressz adaptációs folyamatok jobb megértése alapvető jelentőségű mind a mezőgazdasági művelés, mind a stressztűrő növények nemesítése szempontjából.

A növényi életfolyamatok stresszkörülmények közötti tesztelésére számos módszert dolgoztak már ki, melyeknek egy része a biokémia paraméterek stresszfolyamatok során végbemenő változását értékeli (prolin felhalmozódás, peroxidáz, SOD enzimaktivitás mérése, TBARS meghatározása stb), más részük pedig a stresszen átesett növények megváltozott fiziológia paramétereit jellemzi (fotoszintézis, vízháztartás).

A biokémiai paraméterek közül kiemelt fontosságú a már említett prolin felhalmozódás jelentősége, mely a többi aminosavhoz képest nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben fordul elő például ozmotikus vagy hőstressz esetén (Pálfi-Deim et al. 1989), az ozmoregulációt segítve egyes enzimek ozmotikus stresszel szembeni védelmében is szerepet játszik (Handa et al. 1983; Naidu et al. 1990). A prolin az egyik legszélesebb körben tanulmányozott kompatibilis ozmolit, melynek felhalmozódása a növények stresszekkel szembeni ellenállóságát növeli (Sumithra et al. 2006; Ben Ahmed et al. 2008; Parida et al. 2008; Rai et al. 2010). Sóstressz alatt például több,

meghatározott funkciót is tulajdonítanak a szövetekben történő felhalmozódásának, amelyek magukban foglalják az ozmoreguláció és lipidmembránok stabilitásának fenntartását, a szén és nitrogén tartalék képzését az elszenvedett stressz utáni növekedés biztosításához, a fotoszintetikus aktivitás megőrzésére irányuló szerepet, valamint a szabadgyök hatástalanító képességet (Silveira et al. 2003; Kavi Kishore et al. 2005). Az ozmotikus adaptációban történő prolin felhalmozódás jelentősége még továbbra is vitatott és fajonkénti eltéréseket mutat (Silveira et al. 2003; Meloni et al. 2004).

Hasonlóan a prolinhoz, a glicin-betainok is a vízpotenciált csökkentik a felhalmozódásaikkal ozmotikus, illetve sóstressz esetén különböző fajokban (Szegetes et al. 2000; Quan et al. 2004) Gabonafélékben különösen jó stressz indikátornak tűnik mind szárazság- (Hitz és Hanson 1980), mind pedig sóstressz esetén (Szegetes et al. 2000). Szintén ozmoregulátor funkciókat tölt be, az enzim és fehérje komplexek stabilizálásával, valamint a membrán integritás fenntartásával hatástalanítja a sóstressz károsító következményeit (Quan et al. 2004; Ashraf és Foolad 2007).

A növény által elszenvedett stresszhatások meghatározása szempontjából szintén kiemelkedően fontosak a fiziológiai paraméterekben bekövetkező és mérhető változások. Ha nem áll rendelkezésre elegendő hozzáférhető víz és a párologtatás sebessége meghaladja a vízfelvétel sebességét; a növényekben vízhiány lép fel. A sejtszintű vízhiány hatására a turgornyomás csökkenése következtében az ozmotikumok koncentrációja és a turgor-függő hajtásnövekedés csökkenése következik be (Neumann 1995), mely a párologtatási összfelület csökkentése révén szintén a szárazság stressz elleni védelemben játszik szerepet. Említést érdemel még a gyökér szárazság stresszhez történő fiziológiai adaptációja, az ozmotikus alkalmazkodásnak köszönhető gyökérnövekedés fennmaradása (Sharp et al. 2004), hogy az a nedvesebb, mélyebb rétegek felé növekedjen.

Árpa esetében a liztharmat (*Blumeria graminis*) rezisztenciában szerepet játszó gének funkcionális jellemzésére korábban már kifejlesztettek egy génbelövésen alapuló tranziens expressziós tesztrendszert (Panstruga 2004, Dong et al. 2006). A módszer nemcsak bizonyos génjelöltek tranziens túltermelésének, hanem tranziens indukált géncsendesítésének (TIGS) és a génjelöltek szárazságtűrésében történő szerepének felderítésére is alkalmas (Marzin et al. 2008, Nagy et al. 2011). A doktori értekezésemben bemutatott stressztűrésési kísérleteink során Marzin et al. (2008) által felállított tranziens génbelövési tesztrendszert fejlesztettük tovább. Közleményünkben TIGS-en alapuló tesztelési rendszert dolgoztak ki, melyhez megfelelő markernek bizonyult a zöld fluoreszcens GFP (*Aequorea victoria*) (Shaner et al. 2005, Heim et al. 1995, Tsien 1998) és a vörös fluoreszkáló DsRed fehérje (*Discosoma sp.* Red fluorescent protein). A DsRed fehérje biokémiai tulajdonságai alapján alkalmas arra, hogy jobban

megismerjük és jellemezzük a szárazság stresszt a fluoreszcens fehérjéket termelő árpa epidermisz sejtekben. A DsRed fehérje aktív tetramer komplexszé történő asszociációja ugyanis hosszú és a stressz által gátolt folyamat, ezért a kísérleti rendszerben alkalmazott 4 nap hosszúságú stressz kezelés végeztével megszámlálható vörösen fluoreszkáló sejtek aránya jó indikációja lehet nemcsak az alkalmazott stressz erősségének, de a vizsgált növényvonalunk sejt szintű stressz toleranciájának is. A vízhiányos állapot során kialakult denaturáló körülmények, a felerősödött proteolitikus aktivitás és sejthalál ugyanis módosítja, csökkenti az érett DsRed mennyiségét (Gross et al. 2000, Baird et al. 2000). Marzin et al. (2008) számos szárazságtűréssel összefüggésbe hozható gén árpa mRNS homológját választották ki és próbálták ki a TIGS rendszerben. Négy tesztelt gén eredményezett szignifikáns visszaesést a normalizált DsRed fluoreszcenciában a dehidratációs stressznek kitett leveleken, míg a teljesen turgoros kontroll leveleken nem jelentkezett hatás. Ezek a gének árpa szárazság rezponzív faktor *HvDRF1* (DREB2-like), dehydrin 6, LEA protein *HVA1*, és vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter *HvHNX1* géneket kódoltak. A négy célzott transzkriptorról az is kimutatható volt, hogy gyorsan fölhalmozódnak a dehidratációs stressznek kitett árpa levelekben. Az eredmények azt sugallják, hogy rendszerük eredményesen alkalmazható nagyszámú szárazság stresszben jelölt gén funkcionális tesztelésére árpában.

A stresszhatások következtében megváltozik a fotoszintetikus apparátus működése, ez is a produktivitást alapvetően befolyásoló fiziológiai tényező, ugyanakkor a fotoszintézis a különböző stresszfaktorok, köztük a szárazságstressz egyik fő célpontja is (Chaves és Oliveira 2004). A Napból érkező fényenergia kémiai energiává történő átalakításáért a klorofillok a felelősek. Magasabbrendű növényekben a klorofill-a és -b fordul elő, egymáshoz viszonyított mennyiségük pedig általában 3:1. Környezeti stresszhatások jelenlétekor mennyiségük növekedhet (García-Valenzuela et al. 2005), vagy csökkenhet (Li et al. 2006). Klorofill tartalom mellett a fotoszintetizáló szervezetekben megtalálhatóak még karotinoidok (karotinok és xantofillok) is, mint kísérő pigmentek, melyeknek fontos szerepe van az elnyelt fényenergiának a klorofillok felé történő továbbításában. Abiotikus stresszek esetén a nem fotokémiai kioltás (NPQ) legfőbb komponensei, vagyis a fotooxidatív hatásoktól védik a fotoszintetikus apparátust.

A fotoszintetikus pigmentek stresszhatásra bekövetkező változásaiból is látszik, hogy a stresszfiziológia egyik legjelentősebb területe a fotoszintézis aktivitásának vizsgálata, mely a fény és hőmérsékletviszonyok változása miatt jellegzetes napi görbét mutat, de értéke függ a növény általános élettani állapotától és a környezeti hatástól (vízellátottságtól) is. A szén-dioxid (CO₂) asszimiláció és a sztómafiziológiai folyamatok vizsgálata egymástól elválaszthatatlan, hiszen a transzspiráció és a szén-dioxid felvétele a levelek sztómáin át zajlik le. Zárt sztómák mellett az egységnyi levélfelületen felvett szén-dioxid (CO₂) mennyiségének és a sztómákon

keresztül kiáramló vízgőz mennyiségének az aránya (sztómakonduktancia) alacsony, korlátozott a CO₂ levelekbe történő diffúziója, ami csökkenti a levelek belső, intercelluláris CO₂ koncentrációját (Cornic 2000).

A sztómák záródásának eredményeképpen tehát a CO₂/O₂ arány módosulása várható a Rubisco enzim aktív centrumának közelében, ami a karboxiláz funkció felől az oxigenáz funkció irányába tolhatja el az enzim aktivitását. Ebben az esetben növekszik a fotorespiráció (Lawlor és Cornic 2002; Tezara et al. 1999). A CO₂ asszimiláció gátlása következtében a szárazság stressz során csökken a fotoszintetikus elektrontranszportlánc által termelt ATP és redukáló erő (NADPH+H⁺) felhasználása. Az oxidatív stresszel szembeni védelem fontos része az elektrontranszportlánc túlredukálása elleni védelem, melyben kiemelten fontos szerepet játszik a kettes fotokémiai rendszer (PSII) működésének leszabályozása, illetve a fölös gerjesztési energia alternatív úton (hő formájában) való elvezetése, melyet nem fotokémiai kioltásnak (NPQ) nevezünk.

A klorofill fluoreszcencia a fotoszintetikus apparátus működési megváltozásának nyomon követésére alkalmas paraméter (Fracheboud és Leipner 2003; Zlatev és Yordanov 2004), a klorofill fluoreszcencia analízis segítségével információt kaphatunk arról, hogy a fotoszintetikus apparátus által elnyelt fény milyen arányban hasznosul a fotokémiai útvonalakon, illetve mekkora hányadban fordul más, alternatív utakon történő hasznosulásra. A PS II-t tesztelő ezen mérési eljárás érzékeny a környezeti hatásokra, így gyors és megbízható módszert jelent a stressztolerancia mérésében. Egyes vizsgálatok alapján a vízhiányos körülmények között csökkenhet a maximális kvantumhatékonyság (maximális fluoreszcencia, Fv/Fm); akár már fiatal leveleken (Hassan 2006), vagy búza zászlós leveleken végzett mérések alapján is (Paknejad et al. 2007). A szárazság tolerancia mértékének meghatározására alkalmas mérési paraméternek bizonyulhat a minimális fluoreszcencia (Fo) értékének emelkedése vagy az Fv/Fm és Fv/Fo értékek csökkenése. Li és mtsai. (2006) árpa növényekkel végzett kísérletekben tapasztalt hasonló fluoreszcencia paraméterváltozásokat. Pieters és Souki (2005) munkájában leírta, hogy vízhiány hatására csökkent a PS II elektrontranszportláncának effektív kvantumhasznosítása (ΦPSII) és nőtt az NPQ értéke rizsben, mely a többletenergia hő formájában történő leadását jelenti.

Amint az a fent leírtakból is látszik, a környezetből érkező stresszhatások során fenntartott fotoszintetikus aktivitás fontos ismérve lehet a növények stressztűrésének.

2.7. A termésjellemzők javítására irányuló transzformációs eredmények

Az abiotikus stresszhatásoknak ellenálló növények előállítása mellett a jelenleg folyó árpanemesítési kutatások másik kiemelkedő fontosságú feladata a potenciális termés növelésében van, így például a gyenge szárszilárdság kiküszöbölése, vagy a bokrosodási hajlam javítása a terméshozam javítására irányuló kutatások egyik lehetséges célpontja. A bokrosodási hajlam az egységnyi területről betakarítható növényenkénti kalász-szám szempontjából is termést alakító tulajdonságként szerepeltethető, több olyan rizsgén ismert például (*Oryza sativa* Teosinte branched1/*OsTBI*; *MonoculmI-MOCI*), amelyek mutációs hibája esetén csak egyetlen hajtás alakul ki (Takeda et al. 2003; Xu et al. 2012). A söripár a nagy szénhidrát- (keményítő) (Bohačenko et al. 2006; Stahl et al. 2004) tartalmú fajták előállítását igényli a mezőgazdaságtól. A keményítő tartalom gabonaféléink szemtermésének domináns összetevője, a száraz szemsúly 70 % -át is adhatja, így a keményítő bioszintézis lépései a termés maximalizálásának szempontjából kiemelt figyelmet érdemelnek. Szerkezetét tekintve a keményítő két glükóz polimerből épül fel: az amilóz (a keményítőtartalom 20-30%-a) lineárisan kapcsolódó glükózegységeivel szemben az amilopektin (a keményítőtartalom 70-80%-a) erősen elágazó szerkezetű. Számos biotechnológiai próbálkozás lelhető fel az irodalomban az amilóz-amilopektin arány javításának elérésére. Korábban azt is megállapították, hogy a keményítő tartalom amilóz aránya közvetlen pozitív korrelációt mutat a rezisztens (nem emészthető) keményítő tartalommal (Li et al. 2008; Regina et al. 2006; Shrestha et al. 2010). Az amilopektin szintézis javításához szükséges ún. “elágazást kialakító enzimek” (branching enzyme, BE) csendesítésével az amilóz tartalom emelkedését válthatnák ki. Ezzel a megközelítéssel az amilóz-dúsított keményítő mennyisége szignifikánsan emelkedett búzában (Sestili et al. 2010) és rizsben (Wei et al. 2010a; 2010b). Újabb kutatások eredményei szerint a csendesített “elágazást kialakító enzimmel” transzformált árpa növényeknél az enzimgátlás eredményeképpen kifejlődött szemek egyáltalán nem tartalmaztak amilopektint (Carciofi et al. 2012), azonban a T2 generáció hozama 22 % -kal alább maradt a kontroll növényekhez képest.

A fenti, keményítő tartalom megváltoztatására irányuló kutatások mellett a söripár az alacsony fehérjetartalmú, gyorsan csírázó fajtákkal a maláta minőség javítására (Soupe és Beudeker 1998; Kihara et al. 2000; Matthews et al. 2001) irányuló kutatásokat is megkívánja. Fontosak lehetnek a β -glükán tartalom megváltoztatását célzó kutatások (Jensen et al. 1996; Nuutila et al. 1999), melyek közül egyes próbálkozások a β -glükán bioszintézisének megváltoztatására irányulnak, ami részben a cellulóz-szintáz szerű (F alcsalád) (Cellulose synthase-like F gene, *CsIF*) gén által szabályozott. *Endospermium* specifikus, zab globulin promóterrel meghajtott *CsIF6* gént túltermelő árpa transzformánsoknál 80 % -ig történő β -glükán

emelkedést sikerült elérni (Burton et al. 2011), melynek kiemelten fontos szerepe van táplálkozás-egészségtani szempontból is; a nem inzulinfüggő cukorbetegség, az elhízás és vastagbél rák kockázatának, valamint a koleszterinszint csökkentésére vonatkozóan (Dikeman és Fahey 2006; Truswell 2002).

Takarmányárpában a beltartalmi értékek közül a fehérjetartalom, és fehérjeminőség (nagy lizintartalom) javítására irányuló törekvések folynak (Brinch-Pedersen et al. 1996), ezek közül számos kutatás az árpa lizintartalmának növelését tűzte ki célul. A lizin bioszintézis a citrát-ciklus egyik intermedierjéből, az aszparaginsavból indul ki, kulcslépéseit a dihidropikolinát-szintáz (DHPS) szabályozza. Aktivitása visszacsatoló szintézissel történik, így a fent említett esetben a genetikai módosítás ezen gátlás megszüntetésére irányult. Klónozott, inszenzitív *E. coli* eredetű DHPS génekkel, konstitutív promóterhez kapcsolva transzformált árpa növényekben 20-30 % szabad lizin tartalomnövekedést sikerült elérni (Ohnoutková et al. 2012).

Feltételezések szerint a sejtosztódási ciklus módosításával befolyásolható az endospermium-szövetek vagy az embrió differenciálódása is. A növényi sejtciklus kutatás legfontosabb előrelépéseként az osztódó szövetekben szerepet játszó főbb gének, fehérjék és azok szerepe is meghatározásra került (Dudits 1999). Számos közlemény igazolja a ciklinek, ciklinfüggő kinázok (CDK), foszfatázok vagy a retinoblasztoma és azzal komplexet képező fehérjék nélkülözhetetlen szerepét a sejtosztódás elindításában és lefolyásában (összefoglalóként lásd Dudits et al. 2007). Az emberi tumorszupresszorok közül a retinoblasztoma-fehérjék homológjainak növényi megfelelőit is azonosították. Érdekes következtetésként levonható, hogy kétszikű növényfajokban a növényi retinoblasztóma (Rb) fehérjék génjeinek egyetlen típusa mutatható ki, míg az egyszikű gabonaféléknek viszont legalább két Rb-variáns génjük van, ezek sajátos kifejeződési mintázatot mutatnak a például a rizs egyes szerveiben (Lendvai et al. 2007).

A magasabb terméshozam elérését szolgáló stratégia másik fontos célja lehet a szemtermés méretének (a szemfeltöltődés folyamatának) javítása (Fox et al. 2006), s ezáltal az egységnyi területről betakarítható nagyobb terméshozam (szemmennyiség) elérése. Számos kísérletet végeztek például a citokinin homeosztázis szabályozásának a szemméret kialakításában betöltött szerepének tanulmányozására. Sakamoto és Matsuoka (2008) áttekintve a rizstermést meghatározó gének körét, részletesen értékeli a *Gn1* (grain number 1, szem szám1) QTL okozta szemszámnövekedés hátterét. A térképezést követő génizolálás alapján igazolható volt, hogy a *Gn1* gén egy citokinin (ck) oxidáz/ dehidrogenáz (*OsCKX2*) enzimet kódol, amely a citokinin, mint osztódási hormon lebontásával befolyásolja a virágok számát. Az antiszensz orienátációban beépített *OsCKX2* cDNS csökkentette a belső génről képződött mRNS-molekulák számát, ami több szem kifejlődését tette lehetővé (Ashikari et al. 2005). Transzgénikus árpában pedig a gén

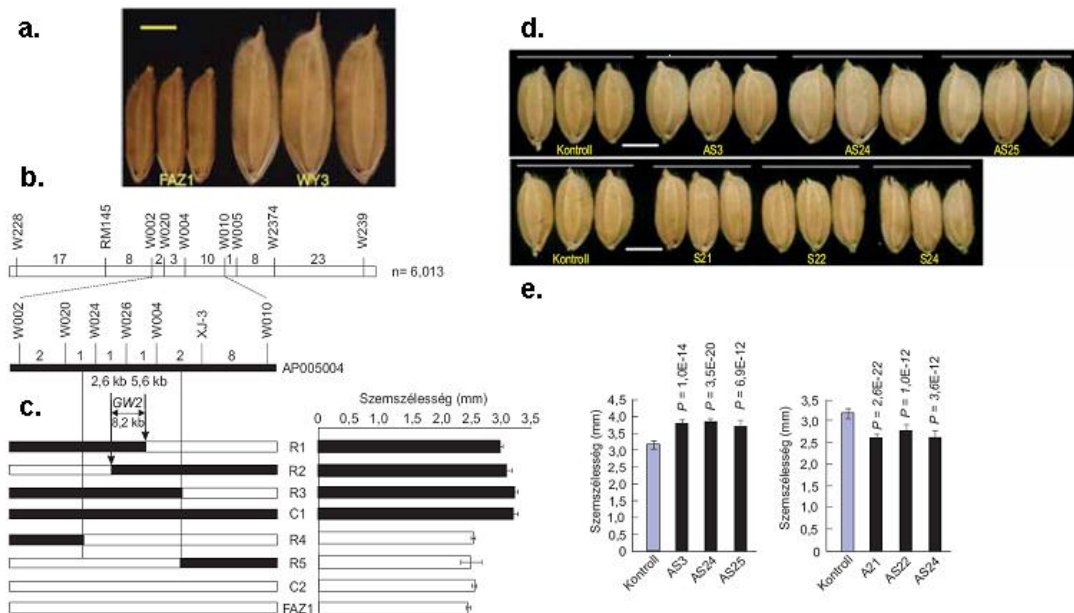
árpa homológjának (*HvCKX* gén) RNS-interferencián alapuló géncsendesítésével 20 %-os terméshozadékot sikerült elérni (Zalewski et al. 2010).

2.7.1. Szemméret meghatározásában szerepet játszó gének jellemzése

A termésösszetevők optimalizálását szolgáló tulajdonságok sok gén által irányított mennyiségi bélyegek, amelyek genetikai determinációjáért felelős kromoszóma régiókat, QTL-eket nagy számban térképeztek már mind a búza-, mind a rizs-kromoszómákon (Wang et al. 2009; Thongjuea et al. 2009). A hasadó populációkon végzett markerezési eljárások lehetővé tették, hogy a nagy hatású QTL-ek háttérben működő gének azonosíthatók és izolálhatóak legyenek. Így a növényi géntechnológia közvetlen szerephez jut a termőképességre történő nemesítésben.

A rizsszem súlyát és hosszát meghatározó GS3 (grain size 3, szemméret 3) lókuszt finomtérképezése után sikerült a GS3 gén cDNS-ét izolálni, amely egy addig ismeretlen transzmembrán fehérjét kódolt (Fan et al. 2006). A nagy szemű fajták GS3 génjének szekvenciaanalízise azt mutatta, hogy a nagy szemű genotípusokat egy non-szensz mutáció jellemzi, s éppen ezért feltételezhető, hogy a GS3 fehérje, mint negatív szabályozó befolyásolja a szemtermés kialakulását, ami alapot ad olyan vektorkonstrukciók előállítására, melyekkel géncsendesítést indukálhatunk.

Egy másik, a rizs 2-es kromoszóma rövid karán elhelyezkedő - a rizs szem tömegét és szélességét meghatározó - QTL, a Grain Weight 2 (*GW2*) gén, melynek géntérképezésen alapuló azonosítását és klónozását Song és mtsai. (2007) végezték el. A szerzők két, szemméretben jelentősen különböző fajta keresztezésével állították elő a térképezési populáció F2 generációját. Mint az 5. ábrán látható, az indica FAZ1 fajta kis szemeket produkál (17,9 g ezerszemsúly), a japonica WY3 fajta szemei pedig igen nagyméretűek (41,9 g ezerszemsúly). Az F1 növények öntermékenyítéséből származó F2 növények visszakeresztezése a FAZ1 növényekkel a BC1F1 generáció szemeit eredményezte. Az ezekből felnevelt növények közül kiválasztották azokat, amelyek heterozigóták abban a *GW2* régióban, ahol a keresett gén található, viszont a FAZ1 szülőre nézve minden más régióban homozigóták. A gén azonosítását követően kiderült, hogy a széles szemű WY3 fajtában hibásan működött a *GW2* gén, amely indokoltá tette antiszensz konstrukciók elkészítését a gén szemméret befolyásolásában betöltött szerepének meghatározására. A szerzők a gént fordított, antiszensz orientációban (AS) fejeztették ki ciszgenikus növényekben, a gén elhallgattatása növelte a rizsszemek szélességét, szensz (S) orientációban történő alkalmazása pedig a szemméret csökkenését eredményezte.



5. ábra: A nagy szemű rizs kialakításáért felelős *GW2* gén izolálása nagyfelbontású genetikai térkép segítségével (újrarajzolva Song et al. 2007. alapján). **a)** a két szülői fajta rizszemeinek mérete; **b)** A *GW2*-régiót közrefogó molekuláris markerek (W024, W004) a második kromoszómán és a rizs genomikus DNS-darab bakteriofág B1 vektorban (AP005004); **c)** stabil rekombináns vonalak a FAZ1 szülőkkel történt visszakeresztezések után, amelyeknek megvan a 8,2 kb *GW2* DNS-régiójuk, széles szeműek, **d)** az antiszensz (AS) transzformánsok szélesebb és a szensz (S) transzformánsok kisebb szeműek a kontroll rizszemekhez viszonyítva; **e)** a konkrét szemméret adatok a kétféle transzformáns vonal növényein.

Két homozigóta, közel izogén vonal összehasonlításából kiderült, hogy a mutáns *GW2* allél a rizs szemek szélességének jelentős növekedésével szignifikánsan megnövelte a szemtermés súlyát, mely a szem vastagságában és hosszában bekövetkezett enyhe növekedéssel párosult. A *GW2* gén egy RING-domént tartalmazó E3 ubiquitin ligáz fehérjét kódolt, mely az ubiquitin-függő proteaszóma rendszerben, a fehérjék lebontásában, degradációjában játszik szerepet. Hagyma epidermális sejteken végzett transziens expressziós kutatások azt mutatták, hogy a GFP-*GW2* (zöld fluoreszcens fehérje, green fluorescent protein) -füziós protein a citoplazmában lokalizálódott és mind a *GW2* transzkript, mind pedig a *GW2* promóter-GFP füziós expressziós analízis azt mutatta, hogy a gén számos szövetben és szervben konstitutívan expresszálódott. Más eredmények azt demonstrálták, hogy a *GW2* génnek pleiotrópikus hatása van, legalábbis a növényenkénti füzérvirágzatok száma, a kalászolási idő és a főhajtáson lévő füzérvirágzat hosszának befolyásolásában, a fő füzérvirágzat szemszámának meghatározása mellett. Ezen pleiotrópikus hatások megjelenése azt mutatta, hogy a szemméret meghatározása mellett a *GW2* fehérje részt vesz számos szerv és szövet specifikus fejlődési folyamatban is.

A RING- domén az ubiquitin ligáz aktivitással rendelkező fehérjékre jellemző, ezek a 26S fehérjebontó enzim komplexumon történő fehérjebontást katalizálják. A RING-domént

tartalmazó fehérjék számos sejtfunció vagy egyedfejlődési folyamatok szabályozásában játszanak szerepet, beleértve a transzkripció, szignál transzdukció, rekombináció és sejtciklus szabályozási folyamatok sokszínűségét. Bebizonyosodott, hogy a GW2 fehérje negatívan befolyásolja a gabonák szemtermés méretét, ami arra utal, hogy a GW2 E3 ligáz aktivitással az ubiquitin mediált proteolízisen át a sejtosztódás negatív regulátoraként funkcionál. Azonban a GW2 gén szerepe a sejtciklus szabályozásában még nem tisztázott. A RING-domén típusú fehérjék többségénél a fehérjék N-terminális vége hat kölcsön az E2 ubiquitin-konjugáló enzimmel, a fennmaradó részen pedig további fehérje-fehérje kölcsönhatási domének találhatóak, melyek a szubsztrátkötésért felelősek (Song et al. 2007). A GW2 gén természetben előforduló WY3 allélja – amely a fehérje egy 310 aminosav delécióval tartalmazó csonka változata – intakt RING-doménnal rendelkezik, így megtartja E3 ubiquitin ligáz aktivitását, a mutációval érintett csonkolt régió pedig a szubsztrát kötő domént tartalmazhatja. A gén funkciójának teljes hiányát okozó null-allél és a füzérvirágzatban található szemtermésben lévő megnövekedett sejtszám egybeesése az sugallja, hogy a WY3 allél nem lép kölcsönhatásba a sejtosztódást befolyásoló szubsztrátokkal, így nem játszik szerepet a fehérje degradációs útvonalban sem.

Az újabb kutatások a GW2 kukorica és búza homológjait is azonosították, azonban a rizs homológokhoz viszonyítva ezek ellentétes hatással rendelkeznek a szemméret megváltozására. Kukoricában a *ZmGW2-CHR4* gén kifejeződése szignifikánsan összefügg a szem szélesség és ezerszemtömeg változásával. Kenyérbúza esetében pedig a *TaGW2* konstitutívan expresszálódik, s mind az A-, B- és D- genom 6-os kromoszómájának homológ részein található. Kínai közönséges búzaszem- gyűjtemény asszociációs alízise azt mutatta, hogy a *TaGW2-A* promóter régiójában lévő genetikai marker a szem szélességet és ezerszem tömegét is szignifikánsan befolyásolja (Li et al. 2010; Su et al. 2011). A *TaGW2* gén kifejeződésének csökkentése pedig a *Triticum aestivum* L. 'Récital' fajta esetében a szemtermés méretének és súlyának csökkenését eredményezte (Bednarek et al. 2012). Ezek az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy a GW2 homológok a szemtermés méretének meghatározásában játszanak szerepet, s fontos eszközként használhatóak a gabonafélék terméshozam javításának céljából.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Növénynevelés, növényanyag

A stabil transzformációs kísérleteket éretlen tavaszi árpa embriókon (*Hordeum vulgare* cv. 'Golden Promise') végeztük.

A transzformációhoz szükséges növényanyag folyamatos biztosítása érdekében az árpaszemeket először üvegházi körülmények között felszaporítottuk. A learatott szemeket virágföld: homok 2:1 arányú keverékébe, 30 cm átmérőjű négyszögletes cserepekbe vetettük. A növénynevelési közeghez cserepenként 6-8 szem Osmocote-ot (Substral) is adagoltunk a megfelelő tápanyag utánpótlás biztosítása végett. A donor növényeket kontrollált körülmények között, üvegházban, 18/14°C (nappali/éjszakai) hőmérsékleten, 12 órás megvilágítással (130 µE fényerősség mellett) neveltük. A transzformációhoz megfelelő fejlettségű kalászok folyamatos biztosítása érdekében egy hónapon át, hetente, folyamatosan több cseréppel is ültettünk a rendelkezésre álló magokból, biztosítva ez által a folyamatos, s egyszerre akár nagyobb mennyiségben történő embrióizolálást is.

A transzformálások során regenerált növényképek üvegházi nevelési körülményei megegyeztek a donor növények nevelési körülményeivel. A kellő nagyságú hajtást és gyökeret fejlesztő növénykéket palántanevelő tálcába, szintén virágföld:homok 2:1 arányú, Osmocote-ot tartalmazó keverékébe ültettük. A megfelelő páratartalom biztosításáról fóliatakarás segítségével gondoskodtunk. Mikor a növények az ültetőközegben kellőképpen megerősödtek, 16 cm átmérőjű, azonos földkeveréket tartalmazó cserepekbe ültettük át őket.

Az árpa leveleken végzett tranziens expressziós, génbelövéses kísérletekhez az árpaszemeket szintén 16 cm átmérőjű cserepekbe, virágföld: homok 2:1 arányú keverékébe vetettük (Osmocote nélkül), és üvegházban nevelve tíz napig, minden kísérlethez azonos nevelési körülményeket biztosítva. A kísérlethez 7-10 napos árpa növénykékről levágott, kb. 6 cm hosszúságú első leveleket helyeztünk 0,5 % (w/v) víz-fitoagar (Duchefa) táptalajra, összesen 6-6 műanyag Petri-csészébe (Ø 6 cm, Greiner) mind a kontroll Golden Promise, mind az MsALR transzformáns vonalakból. A Petri-csészék egyenként 5-5 árpa levelet tartalmaztak.

3.2. Transzformációhoz használt konstrukciók előállítás

Az árpa transzformációs kísérletek lefolytatását a NAP-BIO-„Növényi génforrás” magyar-német együttműködési pályázat biztosította (NKFP-KPI /No-OMFB-00514/ 2007). A transzformációs konstrukciók előkészítése céljából együttműködő partnerünk, Dr. Jochen

Kumlehn a németországi IPK (The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) intézetből (Physiology and Cell Biology Department, Plant Reproductive Biology Group, Gatersleben) bocsátotta rendelkezésünkre az árpa transzformáláshoz használt bináris plazmid vektorokat.

Kísérleteink során az árpa genetikai módosításához a kiválasztott génjelölteket először egy egyszikű növényekben magas szintű átíródást biztosító, intronos ubiquitin promótert és nopalinn szintáz (NOS) terminátor szekvenciát tartalmazó pUbi-AB (DNA Cloning Service, Hamburg, Germany) elnevezésű köztes vektorba klónoztuk. A konstrukció szekvenálással történő ellenőrzése (MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, DNS Szekvenáló Laboratóriuma) után az *SfiI* emésztési helyekkel rendelkező expressziós kazetta ligálása a p6d35S (Hausmann és Toepfer 1999) és a p6U növényi expressziós vektorba (DNA Cloning Service, Hamburg, Germany) történt.

A konstrukciók klónozásához az adott plazmid vektorok specifikus hasító helyei alapján meghatározott restrikciós endonukleázokat, a *BamHI*, *EcoRI*, *XhoI*, *Sall*, *SpeI* (Fermentas), illetve az *SfiI* enzimet (New England Biolabs) használtunk. Az emésztési reakciókat általában 20-30 µl végtérfogatban végeztük a 0.2-1.5 µg hasítani kívánt plazmid jelenlétében, 5-10 egységnyi enzimmel és a gyártó által előírt puffer hozzáadásával. Az enzimreakciók 37 °C –on történtek az *SfiI* enzim kivételével, ahol 50 °C-on zajlottak. Az alkalmazott restrikciós enzim, illetve a reakcióhoz bemért plazmid mennyiségétől függően az inkubációs időtartam gyártói előírás szerint történt.

Az emésztett fragmenteket 1 %-os agaróz gélen futtatuk, a megfelelő nagyságú, restrikciós enzimekkel kihalált fragmenteket a gélből kivágtuk, és GenElute™ Gel Extraction Kit-tel (Sigma, St. Louis, MO, USA) izoláltuk. Az emésztett DNS fragmentek összekapcsolásakor T4 DNS ligáz enzimet (Fermentas) használtunk (ligálás körülményei: 20 µl végtérfogatban, 16 órán keresztül 16 °C -on). A ligálási elegyet *Escherichia coli* XLI Blue MRF' kémiai kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a sejt kultúrát karbenicillin tartalmú (100 mg/l) LB agar táptalajra szélesztettük (Mellékletek, M4.), 37 °C-on 16 órán át növesztettük. A pozitív kolóniákból indított folyékony baktérium kultúrákból GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma) segítségével a gyártó előírásai alapján plazmid DNS-t izoláltunk.

3.2.1. A kompetens sejtek transzformálása plazmid DNS-sel

A 20 µl végtérfogatú ligálási reakcióterméket hozzáadtuk az MRF' kompetens sejtuszpenzióhoz és 30 percig jégen inkubáltuk. Ezután 1 percre 42°C-os vízfürdőbe tettük, majd azonnal 2 percre jégre helyeztük. A sejteket 1 ml Luria Bertani (LB) tápoldathoz adtuk, és

60 percig folyamatos rázatás mellett (200-250 rpm) növesztettük 37°C-on, végül 100 µl -enként szelektív táptalajra (LB + karbenicillin antibiotikum) szélesztettük. A beépített fragmentek meglétét a transzformáns sejtekben kolónia PCR-rel (Polimerase chain reaction, polimeráz lánreakció) és agaróz gélelektroforézissel – 1% -os agaróz gélen – ellenőriztük. A kolónia PCR paraméterei megegyeztek polimeráz lánreakciók körénél leírtakkal. A pozitív kolóniákból indított folyékony baktérium kultúrákból GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma) segítségével a gyártó előírásai alapján plazmid DNS-t izoláltunk.

A különböző konstrukciók előállításának részletes klónozási folyamata, illetve az alkalmazott primerek felsorolása az *Eredmények* fejezetben kerül bemutatásra.

3.3. Árpa transzformáció

Az árpa *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 törzs) által közvetített stabil genetikai transzformációja során Hensel és Kumlehn (2004) által kidolgozott protokollt követtük. A transzforációk során használt táptalajok összetételét a *Mellékletek*, M3. fejezet táblázatai tartalmazzák.

3.4. Genomi DNS izolálás növényi mintákból

A transzgenikus jelölt növények molekuláris jellemzéséhez egy CTAB-ot (Cetyl trimethylammonium bromide) felhasználó módszerrel végeztünk genomi DNS izolálást (Doyle és Doyle 1990). Az izolált genomi DNS-t a transzgén jelenlétét bizonyító PCR reakcióhoz, illetve a kópiaszám meghatározás során real-time kvantitatív PCR munkákhoz használtuk.

3.5. PCR

Az árpa stabil transzformációs kísérleteik során a génjelöltjeink és a szelekciós marker gén jelenlétének DNS szintű bizonyítására a célgénekre tervezett specifikus primerek segítségével PCR reakciókat végeztünk. A PCR reakciókhoz Dream Taq DNS Polimeráz enzimet (Thermo Scientific) használtunk, a gyártó utasításai szerint. A reakcióelegy összetétele 20 µl végtérfogatra számolva a következő volt: 2 µl 20 mM MgCl₂-t tartalmazó 10x Dream Taq Puffer, 2 µl 2 mM dNTP mix, 1-1 µl 10 mM specifikus primerpár, 1,25 egység Taq DNS polimeráz enzim, 1 µg genomi DNS. A végtérfogatra történő kiegészítés steril, háromszorosan desztillált vízzel történt. A reakciók az első ciklus előtt 2 perces, 95 °C-on végzett kezdeti denaturációs lépéssel indultak. A fragmentek sokszorozása 40 cikluson át történt, a ciklusok

során 30 másodperc- 95 °C denaturáció, 30-45 másodperc kapcsolódási (annealing) szakasz a primerek olvadáspontjához viszonyított megfelelő hőmérsékleten (54-64 °C), majd 1 perc 72 °C-on történő elongációs szakasz ismétlődött. Végző szintézisként 10 perces 72 °C-on történő extenziós lépéssel zárult.

A génspecifikus PCR reakciókhoz használt primerek listáját és pontos szekvenciáját, az alkalmazott annealing hőmérséklettel a *Mellékletek* fejezet M2. táblázata tartalmazza.

3.6. RNS izolálás, cDNS-szintézis és valós idejű, kvantitatív, reverz transzkripció PCR (RT-qPCR)

A génexpressziós vizsgálatokhoz szükséges össz-RNS izolálásokat Chomczynski és Sacchi (1987) receptje alapján Tri-reagenssel (Sigma) végeztük. Az RNS koncentrációk meghatározása Nanodrop ND-1000 spektrofotométer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) segítségével történt, 260 nm hullámhosszon. A minták tisztaságára a spektrofotométeren mért OD_{260/280}, illetve OD_{260/230} értékekből következtettünk, arról 1%-os agaróz gélen történő futtatással is megbizonyosodtunk. Az RNS minták genomi DNS szennyezettségétől való megtisztításához DNáz-kezelést alkalmaztunk, RNáz-mentes DNázI (Fermentas) enzim használatával. A tisztított RNS mintákból 2 µg mennyiséget felhasználva RevertAid M-MuLV H Minus Reverz Transzkriptáz (Fermentas) enzim segítségével, a gyártó ajánlásai alapján 20 µl végtérfogatban, random hexamer primerek (MTA SZBK Oligonukleotid Szintézis Labor) jelenlétében cDNS-t szintetizáltattunk. A kapott cDNS-eket real-time (valós idejű) PCR futtatásokhoz használtuk, melyeket az ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System készüléken végeztünk. A reakció lépései a következők voltak: 95 °C-on 10 perc; majd 45 cikluson át 95 °C-on 15 másodperc denaturáció, illetve 60 °C-on 1 percen át tartó kapcsolódási (annealing) szakasszal követve. Az adatok analíziséhez a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert alkalmaztunk (Livak és Schmittegen 2001).

A bemutatott expressziós analízisek során vizsgált géneket detektáló specifikus primer párok pontos szekvenciáit a *Mellékletek* fejezet M2. táblázata foglalja össze.

3.7. Fehérjekivonat készítése és immunoblot analízis

Az összfehérje izolálásához a felhasználásig -80 °C-on tárolt, megközelítőleg 50 mg friss tömegű levélmintáinkat kvarchomok és folyékony nitrogén felhasználásával porrá őröltük, majd 200 µl feltároló puffert (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 75 mM NaCl, 60 mM β-glicerofoszfát, 2 mM 1,4-ditiotreitol, 0.1 % nonil-fenol-polietoxil etanol (NP-40), 1 mM

NaF, 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid) hozzáadva a fehérjéket kivontuk. Tíz percig 4 °C-on, 13000 rpm-en történő centrifugálást követően a felülúszó fehérje koncentrációját spektrofotometriásan meghatároztuk (Bradford 1976).

A kloroplasztisz transzformáns árpavonalak esetében 500 mg friss tömegű levélmintából Kley et al. (2010) által kidolgozott módszer szerint Percoll gradiensen történő centrifugálással intakt kloroplasztiszokat izoláltunk, majd a kloroplasztiszok lizátumaiban vizsgáltuk a megfelelő helyre transzportált MsALR fehérje mennyiségét.

Az immunoblot analízishez 10 µg fehérjét 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elválasztottunk, majd transzferpufferben (1 literhez: 1.45 g TRIS, 7.2 g glicin, 10% etanol) Immobilon-P polivinilidén-difluorid membránra (Millipore) transzferáltuk. A kimutatáshoz α-MsALR poliklonális ellenanyagot és peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG antiszérumot használtunk (Oberschall et al. 2000). A hibridizációt követően a specifikus fehérje kimutatását kemilumineszcens szubsztrát felhasználásával, a gyártó leírása szerint végeztük (Millipore).

3.8. A vizsgált MsALR termelő árpavonalakban a transzgén kópiaszámának meghatározása

Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározását szintén kvantitatív valós idejű PCR technikával, két különböző módszer szerint is elvégeztük.

Az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó, általunk kiválasztott transzgenikus vonal (későbbiekben: MsALR_L3) 5 db transzformáns csíranövényéből (T2 generáció), továbbá a vad típusú Golden Promise csíranövényből genomi DNS-t izoláltunk (CTAB módszer, Doyle és Doyle 1990).

A DNS minták koncentrációjának meghatározásához Nanodrop (ND-1000) spektrofotométert használtunk (kiindulási DNS koncentráció: 50 ng/µl már megfelelően erős jelet adott). A genomi DNS koncentrációjának háromszoros mérés eredményéből kapott átlagértéket tekintettük.

Az első módszer szerint a transzgén beépülési kópiaszámát RT-qPCR-rel határoztuk meg, a $\Delta\Delta C_t$ módszert követve (Livak és Schmittegen 2001). Az *MsALR* transzgéneken kívül az egy kópiás árpa *Blz2* génre (Oñate et al. 1999, GénBank azonosító: Y10834.1), mint belső kontrollra végeztünk PCR analízist. A transzgén és a *Blz2* fragmentjeit a *RT_MsALR_Fw* és *Rev*, valamint a *RT_Bzip3_Fw* és *Rev* primer párok segítségével szaporítottuk fel (lásd *Mellékletek*, M2.). A reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System készülékben. A reakció körülményei a következők voltak: kezdeti denaturáció 10 percig, 95 °C-on, cikluson belüli denaturáció 30 másodpercig 95 °C-on, kapcsolás 60 °C-on 24 másodpercig és

láncosszabbítás 20 másodpercig 72 °C-on. A reakciók hatékonyságát standard görbék alapján becsültük.

A második módszer alapján a kópiaszám meghatározásához szükséges kalibrációs görbe felvételéhez a transzformáláshoz használt plazmid DNS, valamint a transzformáns csíranövényekből és a vad típusú csíranövényekből izolált genomi DNS-ek keverésének módszerét alkalmazva, az előbbi - a transzgénre tervezett - specifikus MsALR primerekkel végeztük a kópiaszám meghatározást Song et al. (2002) által leírt protokollt követve. A transzformáns vonalaknál kapott amplifikációs ciklusszámot a plazmid DNS-en kapott ciklusszámhoz viszonyítottuk.

Az alkalmazott primerek pontos szekvencia adatai a *Mellékletek* fejezet M2. táblázatában találhatóak.

3.9. Tranziens expressziós tesztrendszer anyagai és módszertana: részecskebelövés és stressz kezelés

A tranziens részecskebelövés során az arany szemcsék két tranziens expressziós plazmiddal történő bevonásához Mihály Róbert doktori disszertációjában (2009) részletesen leírt protokollt követtük.

A tranziens tesztrendszer felállításához szükséges vektorokat Dr. Patrick Schweizer biztosította (IPK Gatersleben, Genome Analyses Department, Transcriptome Analysis Group).

A levágott leveleket Marzin et al. (2008) által leírtak szerint génbelövással tranziensen transzformáltuk, majd a belövést követően 24 óráig, nem stresszelt körülmények között hagytuk felhalmozódni a zölden fluoreszcens (GFP) és az éretlen, nem fluoreszkáló DsRED (*Discosoma* sp. RED, vörös fluorescent protein) fehérjét, Parafilm® -mel lezárt Petri-csészékben, klimatizált helyiségben (24 °C állandó hőmérsékleten, nem közvetlen megvilágítással). Egy nap elteltével Olympus SZX12 fluoreszcens sztereo mikroszkóp alatt (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Germany) megszámoltuk a GFP expresszáló epidermisz sejtek számát, majd a levágott levelek 50 % -a stressz kezelés nélküli, víz-fitoagar (0.5 % (w/v), Duchefa Biochemie, Harleem, The Netherlands) táptalajon maradt, fennmaradó másik 50 % -uk pedig kísérletenként eltérő stressz kezeléseken (dehidratáció, só és metilglioxál) esett át, melyeket az alábbiakban részletezett módon hajtottunk végre:

Dehidratációs stressz esetén a levágott levelek 50 % -át tettük ki kiszáritásos stressznek úgy, hogy tömegüket a levágáskor mért kiindulási tömegük 60 % -ára csökkentettük kiszáritással, lamináris boxban (Gelaire, Italy), 22 °C hőmérsékleten, 60±30 perc alatt. Miután elérték a kívánt tömeget, átnedvesített filter papírral (0.25 ml H₂O) ellátott Petri-csészékbe

helyeztük őket, s Parafilm® -mel (Pechiney, Chicago, IL, USA) lezárva, nem közvetlen megvilágítású helyre helyeztük őket.

Sóstressz esetén a stressz kezelt, levágott levelek 175 mM NaCl (nátrium klorid)-ot tartalmazó víz-fitoagar táptalajra kerültek. A NaCl-ot a kívánt koncentrációban autoklávozás előtt adagoltunk a táptalajba.

Metilglioxállal (MG) végzett kezelések esetén a stressz kezelt leveleket 12.5 mM MG-t (Sigma) tartalmazó víz-fitoagar táptalajra kerültek. A MG-t ebben az esetben a táptalaj autoklávozása után, steril körülmények között adagoltuk az előhűtött táptalajhoz.

Mindegyik stressz kezelés esetén mind a kontroll és stressz körülmények között tartott levelek 96 óráig voltak inkubálva. A stressz kezelések végeztével megszámloltuk a levélszegmenseken vörösen fluoreszkáló epidermisz sejteket, s ezek számát normalizáltuk a belövést követően, stressz kezelés nélkül felhalmozódni hagyott zöld fluoreszcens sejtek számával.

A berendezés, illetve a fluoreszcens detektálás során alkalmazott változtatások bemutatása az *Eredmények* fejezetben kerül bemutatásra.

3.10. GFP és DsRED expresszálo epidermisz sejtek mikroszkópos detektálása

A GFP és DsRED expresszálo sejtek számolása Olympus SZX12 fluoreszcens sztereo mikroszkóp segítségével történt. A GFP és DsRED expresszálo sejtekről készült fényképfelvételek Olympus Camedia C7070 digitális kamerával készültek, DScaler szoftver (4.1.15. verzió, www.dscaler.org) használatával. A GFP detekcióhoz használt filter készlet paraméterei a következők voltak: 460-490 nm-en gerjesztő, 505 nm fényelosztó és 510-550 nm emissziós szűrőkészlet, a DsRED expresszálo sejtek detektálásához pedig 530-560 nm gerjesztő, 570 nm fényelosztó és 590-650 nm emissziós szűrőkészlet. Mind a GFP, mind a DsRED expresszálo sejteket a levélszegmensek teljes felületén, azok teljes hosszában számoltuk.

3.11. Klorofill és karotinoid tartalom meghatározása

A méréseket a belövéses kísérleti rendszerben használt leveleken (~300mg, 5 levél/ 6cm Ø Petri-csésze) végeztük, melyeket folyékony nitrogénben porrá őröltünk. A fotoszintetikus pigmenteket 4 °C-os, 80 v/v % koncentrációjú acetoneban való dörzsöléssel extraháltuk. A mintákat centrifugálás után (4°C, 10 perc, 2500 rpm) spektrofotometriásan (Hitachi U-2900) mértük a következő hullámhosszokon: 663,6 és 646,6 nm (klorofill *a* és *b*), valamint 440,5 nm (karotinoidok).

A kiértékeléshez az alábbi képleteket használtuk (Yang et al. 1998):

$$\text{Klorofill } a = 12.25 \times A_{663.6} - 2.55 \times A_{646.6}$$

$$\text{Klorofill } b = 20.31 \times A_{646.6} - 4.91 \times A_{663.6}$$

$$\text{Klorofill } a+b = 17.76 \times A_{646.6} + 7.34 \times A_{663.6}$$

$$\text{Karotinoidok} = 4.69 \times A_{440.5} - 0.267 \times (\text{Klorofill } a + b)$$

A kapott eredményeket $\mu\text{g}/\text{mg}$ értékben a kiindulási friss tömegre vonatkoztatva adtuk meg.

3.12. Mintavétel a prolin és TBARS mérésekhez

A szabad prolin szint és a TBARS mérésekhez történő mintavételhez a génbelövéskor felállított kísérleti rendszert követtük: részecskebelövés nélküli, egy hetes árpa leveleket helyeztünk elsőként fitoagar tartalmú Petri-csészébe, külön a vad típusú Golden Promise fajta, s külön a stabil transzformáns MsALR_L3 és cpMsALR_L1 túltermelő kiválasztott árpavonalainkból. Ezzel párhuzamosan ugyanígy vágunk le leveleket a vad típusú Golden Promise fajtát, valamint a két transzformáns vonalunk leveleiből, melyeket a korábbiakban részletezett módon dehidratáció, só és MG-lal végzett stressz kezeléseken estek át, s inkubálódtak az adott stressz körülményei között 96 óráig.

A levágott levelekről naponta, ugyanabban az időben gyűjtöttünk mintákat: mintavételkori tömegük pontos meghatározása után a minták egyik felét prolin méréshez, másik felét TBARS méréshez folyékony nitrogén segítségével fagyasztottuk.

Az adott stressz kezeléseket, és hozzájuk tartozó mintavételeket háromszor ismételtük, a három mintavételi kísérletből származó átlagértékeket tekintettük a prolin és TBARS mérés eredményeinek.

(A kiszáritásos kísérlet estén közvetlenül a kiszáritás 2 órás időtartamának elteltével is vettünk mintát, ugyanúgy az ez idő alatt fitoagaron lévő levelekről is, majd ezt az említett naponkénti egyszeri, azonos időben végzett mintavételek követték. Minden kísérletnél kezeletlen, közvetlenül cserépről levágott mintákat is gyűjtöttünk.)

3.12.1. Prolin tartalom meghatározása

A prolin tartalom meghatározását a Bates (1973) módszere alapján végeztük. A begyűjtött növényi levélminták súlyának meghatározása után a mintákat 3 % szulfoszalicilsav oldat (5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ friss tömeg) jelenlétében dörzsmozsárban tártuk fel. A mintákat az izolálás teljes befejezéséig jégen tároltuk, majd az összes mintát egyszerre, szobahőmérsékleten 5 perces maximális fordulatszámon centrifugáltuk. 100 μl felülúszót mértünk az előzőleg új Eppendorf

csövekbe készített reakcióelegyhez, melyet 100 µl 3 %-os szulfoszalicilsav, 200 µl tömény ecetsav és 200 µl savas ninhidrin (0,14 M ninhidrin, 60 v/v % ecetsav, 40 v/v % 6M foszforsav) összemérésével kapunk. A mintákat 1 órán keresztül 96 °C-os termosztátban inkubáltuk. A reakciót a minták 10 perces jégen tartásával állítottuk le, majd a színes reakcióterméket 1-1 ml toluollal extraháltuk. Alapos keverés után a mintákat 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A toluolos fázisban a prolin ninhidrinnel alkotott piros színű reakciótermékének mennyiségét spektrofotométer (Hitachi U-2900) segítségével határoztuk meg, OD₅₂₀ nm hullámhosszon, toluol vakpróba ellenében. Előzőleg ismert mennyiségű prolint tartalmazó koncentrációsorok mérésével felállított kalibrációs görbék segítségével történt a prolin koncentráció meghatározása a mintákban

3.12.2. TBARS mérések

A lipidperoxidációból származó bomlástermékek mennyiségét a tiobarbitursav reaktív malondialdehid adduktumok mennyiségi meghatározásával is jellemeztük (Chaoui et al. 1997). Ehhez ~100 mg növényi levélmintát 1 ml 0,25% (w/v) 2-tiobarbitursav (TBA) és 10% (w/v) triklórecetsav (TCA) oldat keverékével dörzsöltünk el. A mintákat 45 percig 85 °C hőmérsékleten inkubáltuk, majd a reakció leállítására végeztünk jégre helyeztük őket. Végül 10 percig maximális fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszó abszorbanciáját 532 és 600 nm hullámhosszon mértük. Kalibráló vakmintának a feltáráshoz használt víz+TBA+TCA keveréket használtuk. Az eredmények értékelése során a malondialdehid tartalmat a $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficiens segítségével számoltuk.

3.13. A pixel alapú szemméret jellemzés digitális fotográfiával

A szemméret meghatározására a T2 nemzedék kiválasztott vonalaiból 80-80 mag tömegét mértük le Ohaus Model EP114C analitikai mérleg (Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA) segítségével (0.1 mg mérési pontosság). A lemért szemeket azonos pozícióban helyeztünk a fényképezés háttérét biztosító szürkésfekete színű tálcára (*Mellékletek*, M5./3. fénykép). A szemekről azonos fényviszonyok és fényképezőgép beállítások mellett C-7070WZ digitális fényképezőgép segítségével, fix állvány segítségével készültek felvételek. A számítógépes analízis során a tálcára illesztett vonalrácsok segítségével az adott mezőkben detektálható szemfelület-színű pixelek alapján végeztünk el a szemméret meghatározást a Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer részét képező SSAP program segítségével (Seed Size Analysis Program, v. 0.95). A program és a fényképek analíziséhez szükséges függvényeket Sass László (SzBK, Növénybiológiai Intézet) fejlesztette.

3.14. Statisztikai analízis

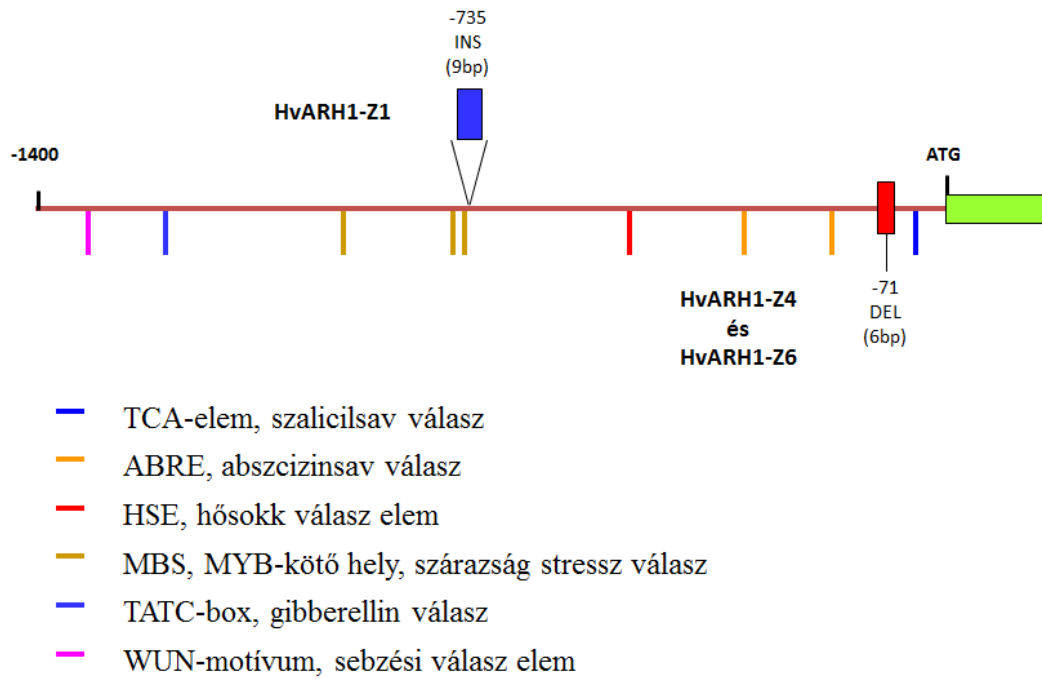
A dolgozatban leírt stressz kísérleteket minden stressz esetében legalább három ismétlésben végeztük el. Minden kísérlet egyenként legalább 16 db Petri-csészébe levágott árpa levelekből állt: 8 db Petri-csészényi vad típusú Golden Promise fajtáról származó levelekből és 8 db Petri-csészébe levágott transzgenikus árpavonalról származó levelekből (a termelt fehérjét a citoszólba felhalmozó MsALR_L3 vagy a kloroplasztiszba felhalmozó cpMsALR_L1 vonalról). Minden egyes Petri-csésze 5-5 darab levágott levelet tartalmazott, melyek teljes levágásnyi levélhosszában vizsgáltuk a fluoreszkáló epidermisz sejtek jelenlétét. A statisztikai elemzések a Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Inc., Redmond, WA, USA) szoftver segítségével készültek el, kétmintás t-próbát alkalmazva, $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek expressziós vizsgálata

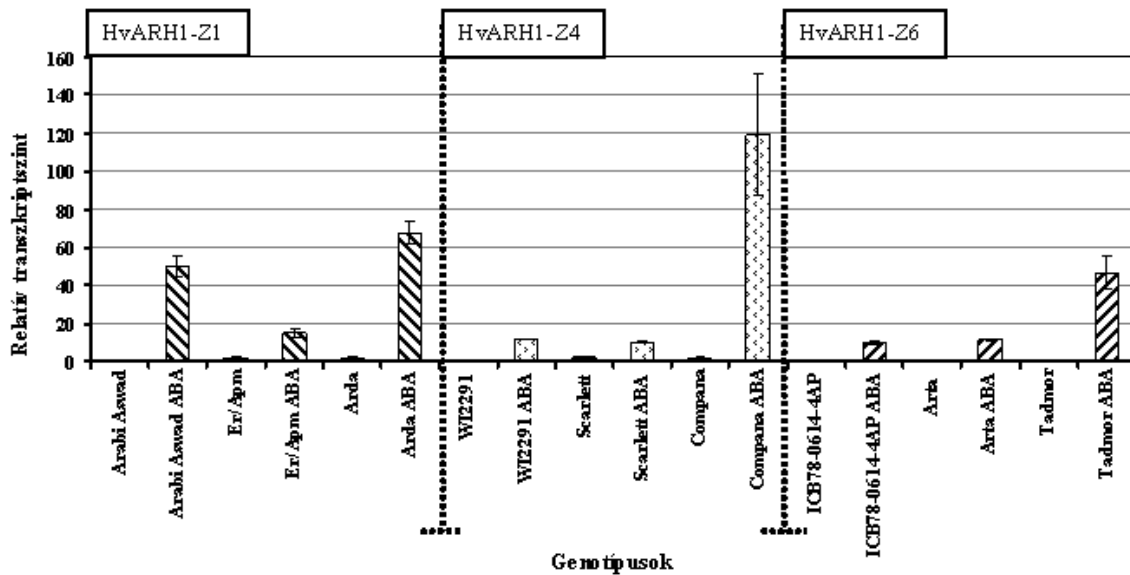
A Törjék Ottó által vezetett Magyar – Német Stressz Genomikai Laboratórium (Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézet, 2009) csoportjának munkájához kapcsolódva vizsgáltuk az árpa 2 saját génjének abszcizinsav (ABA) kezelésre adott expressziós válaszát. A kiválasztott gének a következők voltak: *HvARH1* (*Hordeum vulgare* AR-h gene for aldose reductase), valamint a *HvSRG6* (*Hordeum vulgare* Srg6 gene for Stress Responsive Gene protein 6). Az egyik első, tág körben jellemzett növényi aldo-keto reduktáz enzim az árpa *HvARH1* által kódolt fehérje (Bartels et al. 1991, Roncarati 1995). Ezt az árpa gént szárazságtűrő fajta embrióból készített génbankból izolálták, s az irodalomban fellelhető kísérleti eredmények szerint kifejeződése fejlődés specifikus és hormonregulált: az abszcizinsav (ABA) serkenti, a gibberellinsav pedig gátolja a gén expresszióját. A *HvARH1* gén esetében 3 fő haplotípus (*HvARH1-Z1*, *HvARH1-Z4* és a *HvARH1-Z6*) csoport elkülönítése vált lehetővé. A *HvSrg6* gén szárazságtűrésben betöltött szerepének és ABA kezelés hatására adott expressziós változás-vizsgálatának alapját Malatrasi és mtsai. által (2002) leírt eredmények adták. Az árpa *SRG6* gént, double haploid (DH) térképezési populációk vizsgálatánál a 7H kromoszóma olyan konzervált régiójába datálták, amely régió szoros összefüggésbe hozható az árpa és egyéb gabonafélék ozmotikus stressz adaptációban betöltött szerepével. A gén ABA indukált expressziós változásainak vizsgálatát kezdtük meg 5 olyan genotípus között, amelyek a teljes hosszúságú promóter szekvenciát tartalmazták, illetve 3 olyan genotípusban (Otis, Chilga és Diamond), melynek promóter régiója a transzlációs starttól 158 bp távolságra egy 197 bp nagyságú inszerciós-deléciós mutációt tartalmazott.

A *HvARH1* gén esetében a korábban 3 fő haplotípus csoportba (*HvARH1-Z1*, *HvARH1-Z4* és a *HvARH1-Z6*) sorolt genotípusok közötti legfontosabb eltérés a *HvARH1-Z4* és *HvARH1-Z6* haplotípus csoportokon belül a promóter régióban, a transzlációs starttól 71 bázispárnyi távolságra upstream irányban elhelyezkedő 6 bp hosszúságú deléció, illetve a *HvARH1-Z1* haplotípus csoport esetében a promóter régióban, a transzlációs startponttól 735 bp távolságra upstream irányban elhelyezkedő 9 bp hosszú inszerció volt (6. ábra).



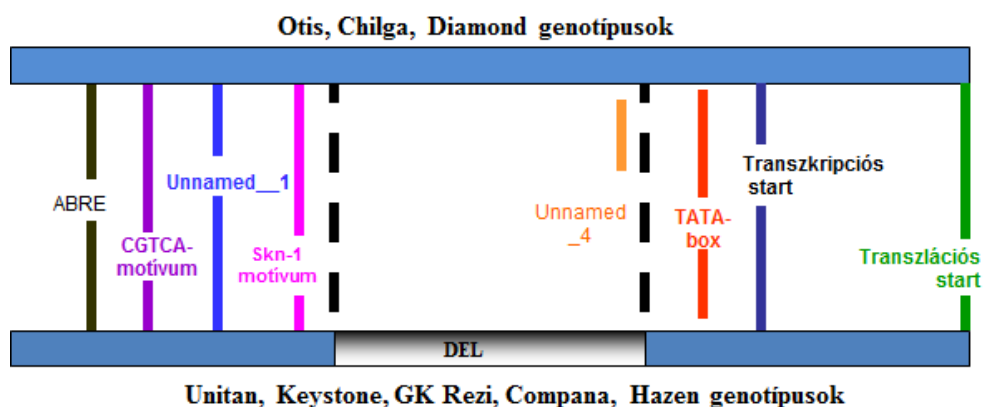
6. ábra: A *HvARH1* gén promóterének cisz-ható elemei és az egyes haplotípus variánsok

Mindhárom haplotípus csoporton belül 3-3 genotípusban vizsgáltuk az inszerciós-deléciós mutációk hatását az ABA- indukált génexpressziós változásokban. Az RT-qPCR során kapott értékeket minden esetben kétszeresen normalizáltuk. Először a *18S rRNS* génhez, mint endogén referencia génhez (RT_18S_Fwd és Rev primerek, *Mellékletek*, M2.), másodsor pedig az adott kísérletben szereplő kontroll mintához, ebben az esetben a vizes kontroll kezelt mintákhoz. A *HvARH1* gén expressziós analíziséhez az RT_HvARH_Fwd és Rev primer párokat használtuk (*Mellékletek*, M2.) A 6 hetes leveleken végrehajtott 24 órás, 50 μ M ABA kezelés hatására minden esetben erőteljes gén indukciót tapasztaltunk, ami a relatív transzkriptszint vizes kontroll kezelt mintákhoz viszonyított szignifikáns emelkedésében nyilvánult meg (7. ábra). A legkifejezettebb, s egyben az adott haplotípuson belül a leginkább egyöntetűbb változást a HvARH1-Z1 haplotípushoz tartozó genotípusokban tapasztaltunk, ebben a csoportban a génexpresszió 20-60-szoros növekedést mutatott a vizes kontroll kezelt leveleken mértekhez. A Z4 és Z6 haplotípusba tartozó tájfajták alacsonyabb, 10-szeres gén expressziós szintet produkáltak. A Z4 haplotípushoz tartozó *Compana* genotípusban detektált kimagasló expressziós szint azonban előrevetítette a nagyobb mintaszámmal végzendő további génexpressziós vizsgálatok (statisztikai) szükségességét.



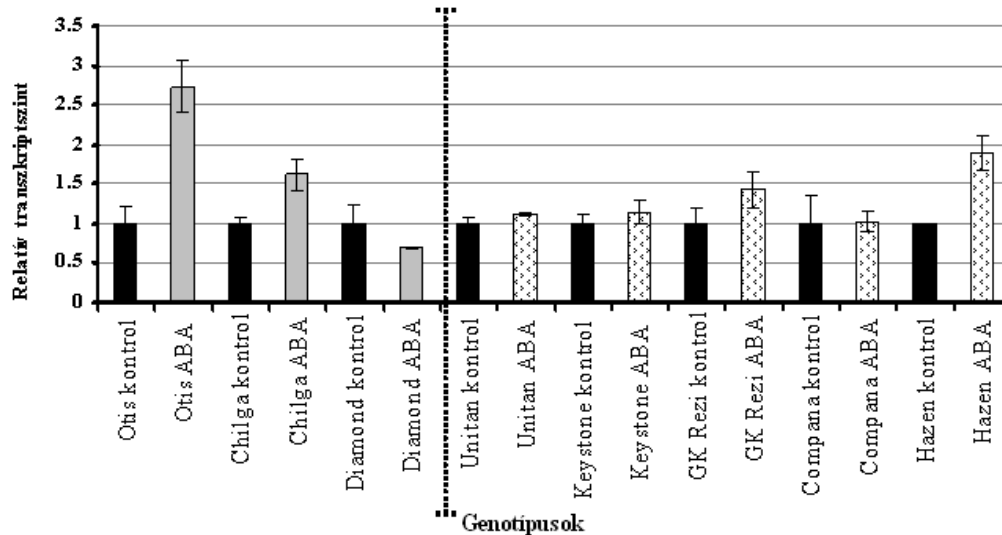
7. ábra: A három fő HvARH1 haplotípus csoportba tartozó genotípusok ABA kezelés hatására adott géneexpressziós változásainak vizsgálata. Kezelés: 50 μ M ABA oldattal, 24 órán át. Kontroll minták: 24 órás vizes kontroll genotípusok.

A *HvSrg6* gén esetében az ABA indukált expressziós változásokat 5 olyan genotípusban vizsgáltuk meg, amelyek a teljes hosszúságú promóter szekvenciát tartalmazták, illetve 3 olyan genotípusban (Otis, Chilga és Diamond), melynek promóter régiója a transzlációs starttól 158 bp távolságra egy 197 bp nagyságú inszerciós-deléciós mutációt tartalmazott (8. ábra).



8. ábra: A *HvSRG6* gén promóter analízise (PlantCare, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

Endogén kontrollnak szintén a 18S rRNS gént használtuk, génjelöltünk expressziójának változásához pedig az RT_SR6_Fwd és Rev primereket (Mellékletek, M2.) alkalmaztuk. Az előző expressziós analízissel szemben itt az irodalmi adatokat követően jóval magasabb, 10 mM koncentrációjú ABA kezelést alkalmaztunk, melynek hatására azonban csak moderált géneexpressziós változást tapasztaltunk, ennek a változásnak a nagysága 2,7 szerez indukciótól - 0,7 szerez represszióig érő tartományban mozgott (9. ábra).



9. ábra: *HvSRG6* gén expressziós változásainak vizsgálata 10 mM ABA kezelés hatására. Otis, Chilga, Diamond: a teljes hosszúságú promóter szekvenciát tartalmazó genotípusok, Unitan, Keystone, GK Rezi, Compana, Hazen: a 196 bp nagyságú inszerciós mutációt hordozó promóterrégióval jellemezhető genotípusok.

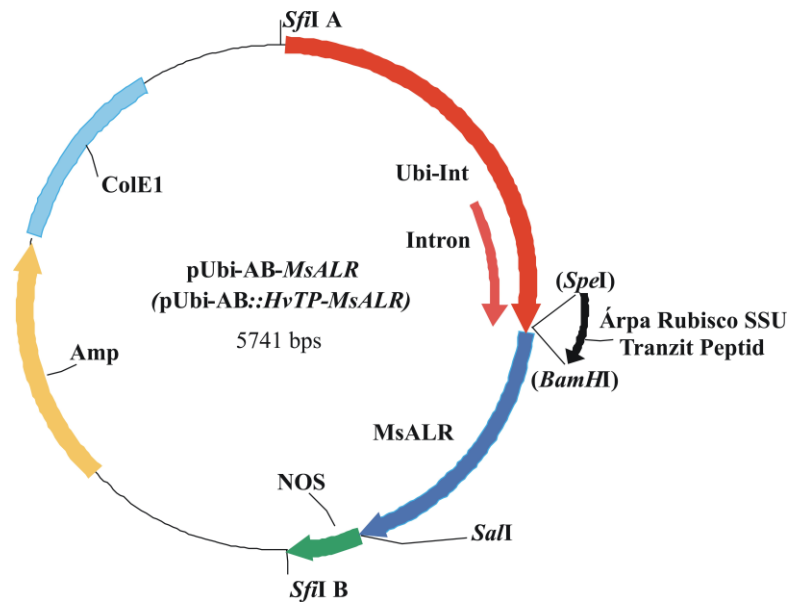
4.2. A stabil árpa transzformációhoz szükséges konstrukciók előállítása, árpa transzformáció az *MsALR* génnel

Az árpa *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített stabil transzformációs technológiáját egy gaterslebeni kutatóintézetben, az IPK-ban (Leibniz Institut für pflanzen genetic und kulturpflanzenforschung) tett külföldi tanulmányút (3 hónap, 2007. április 14. - július 4.) keretében sajátíthattam el. Kísérleteim egyik elsődleges célja ennek a transzformációs technológiának az itthoni laborkörülményeink közé történő adaptálása volt. Első lépésként a kint elvégzett transzformációk itthoni megismétlését tűztük ki célul, elsősorban a transzformációs technológia sikerességének és hatékonyságának összehasonlítása céljából.

Az *MsALR* gén által kódolt fehérjét a citoszólba (p6d35S-*MsALR*) és a kloroplasztisba (p6d35S-*HvTP*-*MsALR*) juttató vektorkonstrukciók előállításához kiindulási konstrukcióként egy, korábban a csoportunkban előállított, és növény transzformációhoz használt konstrukciót alkalmaztunk, mely az *MsALR* gént a C-terminálison 6x His-jelölten tartalmazta.

1. Ezen konstrukciót *BamHI* és *XhoI* enzimekkel emésztettük. A kihalított fragmentet (966 bp) a köztes pUbi-AB vektor *BamHI* és *Sall* restriktív enzimekkel emésztett helyeire ligáltuk. Az elkészült köztes (intermediér) pUbi-AB::*MsALR* konstrukciót (10. ábra) emésztéssel és a DNS nukleotidsorrend meghatározásával, szekvenáltatással (GH-Ubi-F1 és GH-NOS-R1 primerekkel, *Mellékletek*, M2.) ellenőriztük.
2. A megfelelőnek bizonyult konstrukció *SfiI* restriktív enzimmel történő emésztésével kivágott expressziós kazettát a szintén *SfiI* által emésztett p6d35S növényi expressziós

vektorba ligáltuk. A bakteriális tenyészetben spectinomycin/streptomycin antibiotikumokkal szelektáltunk (Mellékletek, M4.).



10. ábra: Az *MsALR* génről termelt fehérjét a citoszólban (pUbi-AB-*MsALR*) vagy a kloroplasztiszban (pUbi-AB::*HvTP-MsALR*) felhalmozó köztes (intermediér) klónozó vektorkonstrukció felépítése. *SfiI A* és *B*: emésztési helyek a növényi expressziós vektorba ligáláshoz, *Ubi-Int*: intronos ubiquitin promóter, *Nos*: nopalín-szintáz terminátor, *Amp*: ampicillin szelekciós markergén, *ColE1*: replikációs origó. *SpeI*, *BamHI*, *SalI*: alkalmazott restriktív enzimek emésztési helyei. *MsALR*: *Medicago sativa* aldóz redukáz gén.

Az *MsALR* fehérjét termelő vektorkonstrukciók előállításakor felmerült a kérdés, hogy az oxidatív stressz során keletkező reaktív karbonil vegyületek eltávolítása a citoplazmában vagy a kloroplasztiszban fontosabb, esetleg a detoxifikáló enzim együttes jelenléte növelheti-e meg jobban a stressz ellenállóságot. Ennek eldöntésére olyan konstrukció előállítását kezdtük meg, mely lehetővé teszi az egyes detoxifikáló tulajdonságú fehérjék kloroplasztiszbba történő transzportját.

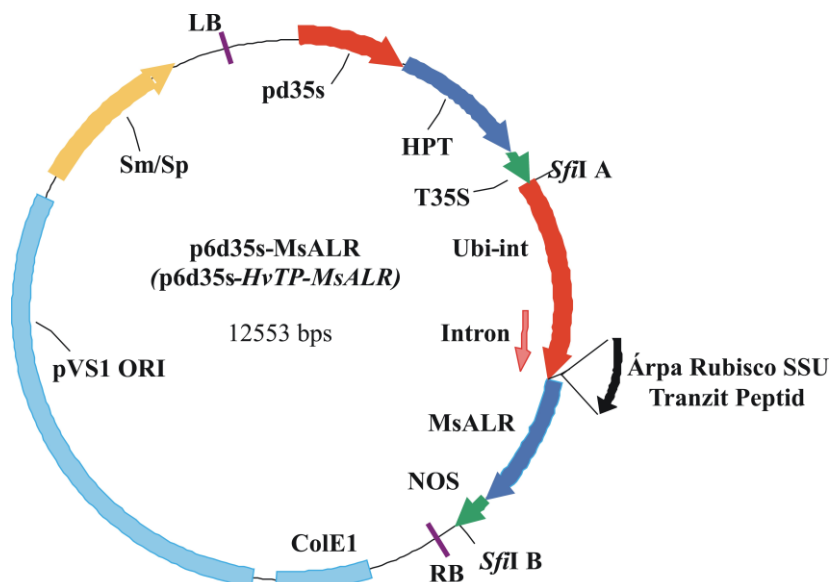
A tranzit peptidet kódoló konstrukció elkészítéséhez első lépésként adatbázisokban azonosítottuk az árpa Rubisco komplexének kis alegységét (SSU - Small SubUnit) kódoló gént (génbanki azonosító: U43493), majd meghatároztuk benne a kloroplasztisz tranzit peptidet kódoló szekvenciát. Olyan primereket terveztünk a megfelelő szekvencia (168 bp) felamplifikálására, amelyeket mind genomi DNS-en, mind cDNS-ről történő sokszorozásra is használhattunk. A primerek a *HvTP_SpeI_Fwd* és *HvTP_BamHI_Rev* párok voltak (Mellékletek, M2.).

- A PCR terméket a primerekkel képzett restriktív endonukleáz helyeken (*SpeI* és *BamHI*) emésztettük, az emésztés eredményét agaróz gélen tisztítottuk és a szintén *BamHI* – *SpeI* enzim által emésztett köztes vektorba ligáltuk.
- A ligálási elegyet *E. coli* XLI Blue MRF⁺ kémiai kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a sejteket karbenicillin tartalmú LB táptalajra szélesztettük (Mellékletek, M4.). Az

így kapott pozitív telepekből folyékony baktérium kultúrát indítottunk, majd azokból plazmid DNS-t izoláltunk.

Mivel a primerek *SpeI* és *BamHI* restrikciós endonukleáz felismerő helyeket tartalmaztak, ezért a tranzitpeptidet kódoló szekvencia az emésztést követően a pUBI-AB transzformációs vektor első, egyszeres hasítással bíró restrikciós helyeire volt ligálható, így a klónozó régió többi hasítási helye változatlanul használható maradt. A kapott pUbi-AB::*HvTP* alapvektor-konstrukciót ezen a ponton több irányból történő szekvenálással is ellenőriztük, így megbizonyosodhattunk arról, hogy az általunk létrehozott konstrukció a későbbiekben is alkalmas különböző génjelöltek fehérjéinek kloroplasztiszba történő irányítására. Következő lépésként az MsALR fragment klónozása következett:

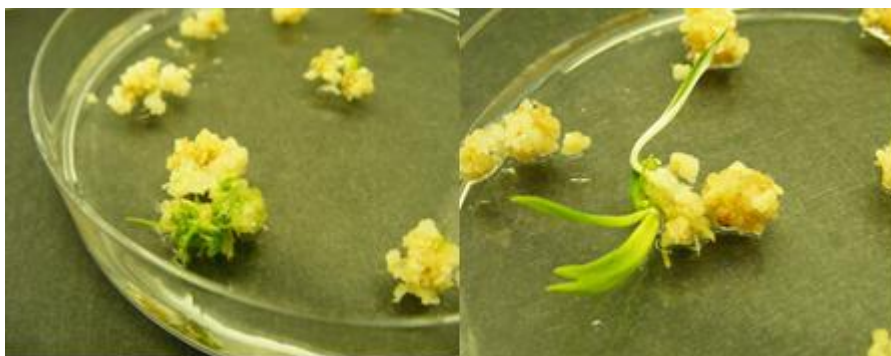
- A korábban már elkészített és a fentiekben részletezett pUbi-AB-*MsALR* köztes konstrukcióról az *MsALR* gént tartalmazó fragmentet (996 bp) PCR segítségével (*MsALR_BamHI_Fwd* és *MsALR_XhoI_His_Rev* primerekkel) sokszoroztuk. A PCR terméket a primerekkel képzett restrikciós helyeken emésztettük.
- A szekvenálással szintén megfelelőnek bizonyult „köztes vektor:: tranzit peptid” összekapcsolásával létrejött pUbi-AB::*HvTP* alapvektort *BamHI* – *Sall* enzimekkel emésztettük. A fragmentet a vektorba ligáltuk, a ligálási elegy transzformálásából származó pozitív *E. coli* kolóniákból plazmid DNS-t izoláltunk, majd a restrikciós emésztéssel ellenőrzött konstrukció nukleotid sorrendjét meghatároztuk.
- Az *MsALR* fehérjét a kloroplasztiszba irányító pUbi-AB-*HvTP*-*MsALR* köztes vektorkonstrukció (11. ábra) *SfiI* enzimmel való emésztésével juttattuk a kivágott expressziós kazettát a p6d35s növényi expressziós vektorba.



11. ábra: Az *MsALR* génről termelt fehérjét a citoszólban vagy a kloroplasztiszban felhalmozó növényi expressziós vektorba épített konstrukció felépítése

Génjelöltjeink fehérjéjét a citoszólba, illetve a kloroplasztisza irányító *MsALR* konstrukciókat LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe transzformáltuk (*Mellékletek*, M4). A Németországban végzett transzformációs kísérletek során konstrukciónként (p6d35S-*MsALR*) 360-360 darab embriót izoláltunk. Az izolált embriókból a p6d35s-*MsALR* konstrukció esetében 342 db embriót tudtunk elkalluszosítani a transzformációt követően a higromicin szelektív markert 50 mg/l koncentrációban tartalmazó szilárd CIM₃ táptalajon (*Mellékletek*, M3.). Később a növényregeneráláskor a már zöldülő, regenerálódásnak indult kalluszosokról (12. ábra) a hajtást és gyökereket fejlesztő növénykéket ugyanazon K4N regeneráló táptalajt tartalmazó üvegcsovekbe helyeztük. A külföldi transzformálások során összesen, 48 darab növénykét regeneráltunk az *MsALR* gént hordozó konstrukció esetében. Ezek 39 (*MsALR*) darab független transzformáns vonalat jelentettek (11,4 % transzformációs hatékonyság. (A táptalajok összetételét lásd *Mellékletek*, M3. fejezete.)

Ezen árpa transzformációkat a transzformációs módszer labor körülményeinkhez történő adaptálása során az itthoni laborunkban is megismételtük. A transzformáció során 20 darab embriópajzsot transzformáció nélkül tartottunk a 2 napos inkubálás során az embrióizoláló tápoldatban, majd a megfelelő szelektív táptalajon, negatív kontrollként szolgálva a későbbi kalluszosodásnak indult és regeneráló kalluszok mellett. Természetesen a nem transzformált kontroll embriók a kalluszindukciós táptalaj magas higromicin (50 mg/l) tartalma mellett nem növekedtek, gyorsan elhaltak. A Szegeden végzett első transzformációs kísérletek során mindkét fent említett konstrukcióhoz 180-180 darab embriót izoláltunk, viszont az elkalluszosított embriókból regenerált független transzformánsok száma (transzformációs hatékonyság) ebben az esetben magasabb volt a tanulmányutam során végzettnél. Az aldóz redukáz túltermelő árpa transzformánsok esetében 24 darab független transzformáns vonalat sikerült regenerálni (14.3 %).



12. ábra: Golden Promise árapajtá regeneráló kalluszai K4N táptalajon a transzformáció időpontjától számított 7. héten

A p6U expressziós vektor alkalmazása esetén azonban a transzformáció alacsony hatékonyságúnak bizonyult, melynek végén nem tudtunk növényt regenerálni.

A termelt MsALR fehérjét a kloroplasztiszba targetáló vektorkonstrukció esetén 210 embriót izoláltunk, majd a transzformáció során 115 embriót sikerült elkalluszosítanunk. Ennek oka az embrióizolálás után a lemosást követően fellépő *Agrobacterium* túlnövés volt, melynek valószínűsíthető oka az inkubálást követően végzett lemosások nem elegendő száma. Az elkalluszosodott embriókból így mindössze 13 növényt sikerült regenerálni, ezek csak 5 független transzformáns vonalhoz tartoztak (4,4 % transzformációs hatékonyság) (1. táblázat).

1. táblázat: Transzformációs hatékonyság az alkalmazott vektorkonstrukciók esetében, illetve a transzformáció során regenerált növények számok összesítő táblázata. (Transzformációs hatékonyság = a kalluszosodott embriók száma / független vonalak száma * 100)

Konstrukciók	Izolált embriók	Kalluszosodott embriók	Regenerált növények	Független transzformáns vonalak	Transzformációs hatékonyság
p6d35s- <i>MsALR</i> (Gatersleben)	360	342	48	39	11,4 %
p6d35s- <i>MsALR</i> (Szeged)	180	168	39	24	14,3 %
p6d35s- <i>HvTP- MsALR</i> (Szeged)	210	115	13	5	4,4 %

4.2.1. A transzformáns növények molekuláris jellemzése, a transzgén beépülésének igazolása

A transzgenikus jelölt T0 (és a későbbiekben felszaporított T1 és T2) generációjú növények leveléből és vad típusú kontroll növényekről (transzformáció nélküli Golden Promise fajtából) származó levelekből genomi DNS-t izoláltunk és PCR technikával igazoltuk egyrészt a szelekciós markergén (hygromycine phosphotransferase, *hpt*) jelenlétét, másrészt a transzformációhoz használt transzgén beépülését.

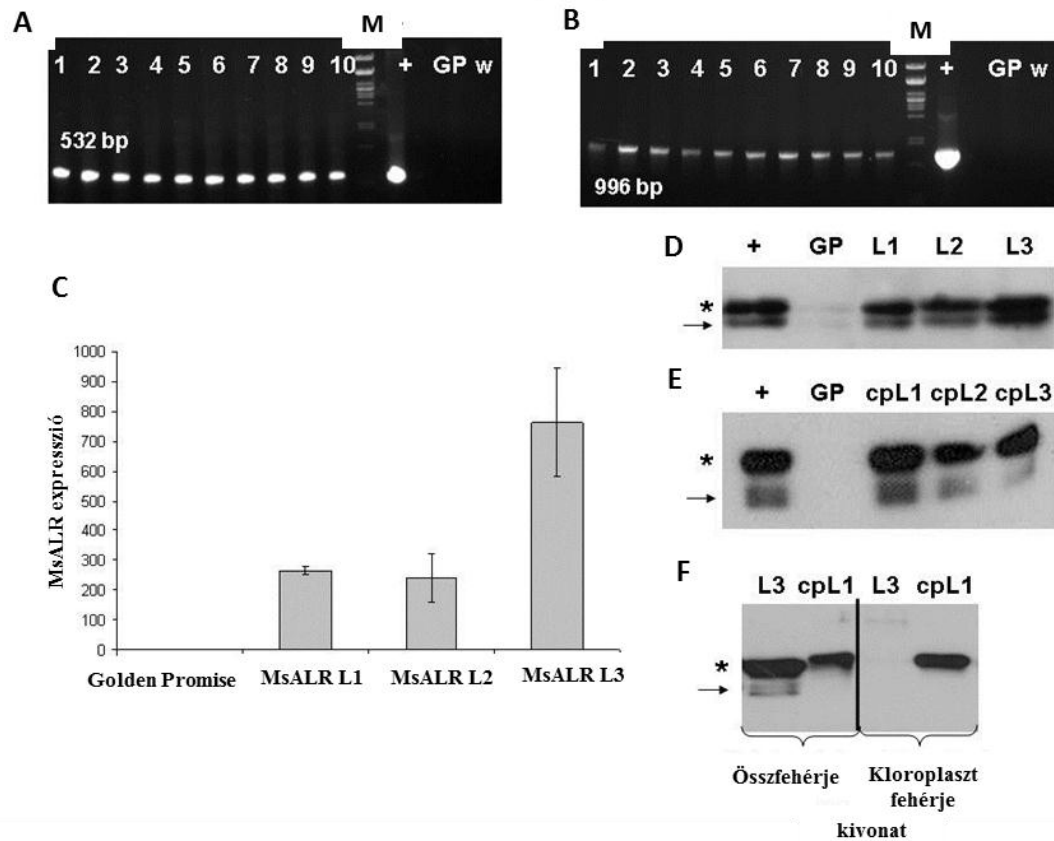
A specifikus PCR reakciók eredményei alapján megbizonyosodhattunk a vizsgált transzgenikus szekvenciák jelenlétéről. A transzformáció hatékonyságának molekuláris bizonyítását az általunk itthon létrehozott transzformáns vonalak példáján, először a szelekciós markergénre tervezett PHYG_Fwd és Rev primer párokkal (amplifikált fragment hosszúsága 532 bázispár, primerek szekvenciája a *Mellékletek*, M2. táblázatában található) végzett PCR reakciók példáján szemléltetjük (13/ A. ábra). A vizsgálatok igazolták, hogy az árpa transzformáció során

alkalmazott magas antibiotikum szelekció (50 mg/l higromicin) következményeként a szelekciós markergén jelenlétére vizsgált vonalak mindegyike pozitívnak bizonyult.

Hasonló eredménnyel szolgáltak a transzformált génjelöltre (*MsALR*) végzett PCR reakciók is. (13./ B. ábra). A korábban szelekciós markergén jelenlétére pozitívnak bizonyult minták az *MsALR* génre végzett PCR reakciók során is pozitív eredményeket szolgáltattak (amplifikált fragment hosszúsága 996 bázispár, *MsALR BamHI_FW* és *MsALR_XhoI_His_Rev* primerek szekvenciája a *Mellékletek*, M2. táblázatában található). A vad típusú Golden Promise (GP) mind a kettő primerpárra nézve negatív, míg a transzformációhoz használt pozitív plazmid kontroll, hasonlóan a transzformáns jelölt vonalakhoz, mind a kettő primer párra nézve pozitív jelet adott. A PCR reakciókat elvégeztük valamennyi transzformáns jelölt növény esetében.

A transzgén expressziójának bizonyítására kvantitatív RT-qPCR reakciókat is végeztünk, melynek eredménye jelentős eltéréseket mutatott a transzformált gén relatív expressziójában (13./ C ábra). Ezen eredményünket igazolták a későbbi *MsALR* fehérjeszint analízisek eredményei is, melyek korrelációt mutattak a korábbi génexpressziós RT-qPCR vizsgálatokkal is (13./ C és D ábra).

A lucerna aldóz reduktáz fehérjéjét túltermelő árpavonalak esetében tehát a transzgén beépülését és a transzgén által kódolt fehérje termelődését együttesen bizonyítottuk az immunoblot analízissel. Az immunoblot analízis során tesztelt növényvonalak, bár vonalanként gyakran eltérő erősségű expressziós jelet adtak, megbizonyosodhattunk arról, hogy a transzformáns jelölt árpavonalak a pozitív dohány kontroll erősségéhez mérhető jelet mutattak, másrészt, hogy a korábban dohány transzformánsok teszteléséhez használatos ellenanyag az árpa transzformánsok esetén is biztonságosan alkalmazható. A későbbi tranziens expressziós kísérleteinkhez, és kópiaszám meghatározáshoz egy erősebb expressziós jelet adó vonalat, az ábrán L3 jelöléssel ellátott vonalat használtuk.



13. ábra: Az MsALR transzformáns növények molekuláris analízise: a transzgén beépülésének és expressziójának igazolása

T0 regenerált növények transzgenikus voltának igazolása a *HPT* (A) és az *MsALR* (B) transzgénekre végzett PCR reakciók eredményével. 1-10: transzgenikus jelölt árpa vonalak +: pozitív plazmid kontroll, GP: nem transzformáns Golden Promise, w: üres (víz-water) kontroll. (C) Az *MsALR* gén relatív expressziójának meghatározása Real-Time PCR analízis segítségével, három független citoszólos transzformáns T2 generációjú vonalon. (MsALR L1-L3). Az átlag és szórás értékek (STDEV) három független kísérlet eredményeit reprezentálják (D) Fehérje immunoblot analízis eredménye három független, különböző expressziós szinttel jellemezhető citoszólos transzformáns vonalon elvégezve. (E) A termelt fehérjét a kloroplasztba targetáló, három független transzformáns jelölt vonalak immunoblot analízisének eredménye (cpL1, cpL2, cpL3) + *Nicotiana tabacum* pozitív kontroll (TR1/5 line, Oberschall et al. 2000), GP: nem transzformált Golden Promise (F) Totál és kloroplaszt fehérje kivonatok összehasonlító eredménye két transzformáns vonal példáján bemutatva (cpL1 - a termelt fehérjét a kloroplasztba targetáló vonal, L1 - a termelt fehérjét a citoszólba targetáló vonal). A csillagok és nyilak a teljes hosszúságú MsALR fehérjét és bomlástermékeit jelölik. MW: molekula marker, λ /PstI.

(D) Fehérje immunoblot analízis eredménye három független, különböző expressziós szinttel jellemezhető citoszólos transzformáns vonalon elvégezve. (E) A termelt fehérjét a kloroplasztba targetáló, három független transzformáns jelölt vonalak immunoblot analízisének eredménye (cpL1, cpL2, cpL3) + *Nicotiana tabacum* pozitív kontroll (TR1/5 line, Oberschall et al. 2000), GP: nem transzformált Golden Promise (F) Totál és kloroplaszt fehérje kivonatok összehasonlító eredménye két transzformáns vonal példáján bemutatva (cpL1 - a termelt fehérjét a kloroplasztba targetáló vonal, L1 - a termelt fehérjét a citoszólba targetáló vonal). A csillagok és nyilak a teljes hosszúságú MsALR fehérjét és bomlástermékeit jelölik. MW: molekula marker, λ /PstI.

Az MsALR fehérjét a kloroplasztiszbba targetáló transzgenikus jelölt növényeinken a termelt fehérje kloroplasztiszbba történő felhalmozódását is Western-blot analízissel igazoltuk. A jelölt vonalokból izolált kloroplasztiszbba fehérje kivonatokkal végzett kísérleteket a 13./ E ábra mutatja. A képen láthatóan az immunoblot vizsgálatok itt is erős, a citoszólos akkumulációt mutató transzformánsokkal összemérhető jelet adtak (13./ F ábra). A termelt fehérjét a kloroplasztiszbba targetáló transzformáns növényvonalaink közül a későbbi tranzien্স expressziós kísérleteinkhez az ábrán cpL1 jelöléssel ellátott vonalunkat használtuk.

Ez a transzformációs stratégia több szempontból is fontos lehet a továbbiakban. Részint elérhetjük a fotoszintetikus apparátus stresszel szembeni jobb védelmét azáltal, hogy a detoxifikáló enzimeket (jelen esetben a reaktív aldehideket átalakító aldóz reduktázt) közvetlenül a kloroplasztiszba juttatjuk, részint csökkenthetjük annak a veszélyét, hogy a nagy mennyiségben termelt enzim esetleg károsan befolyásolja a növény fejlődését.

4.2.2. A transzgén kópiaszámának meghatározása

Az aldóz reduktáz fehérjét a citoszólban felhalmozó MsALR_L3-es jelölésű növényvonalon a transzgén kópiaszámának meghatározását is elvégeztük. A kísérlethez a kiválasztott vonal 5 db csíranövényéből és a vad típusú Golden Promise egy csíranövényéből genomi DNS-t izoláltunk és velük RT-PCR reakciókat futtattunk.

Az első módszer alapján egy irodalmi adatok alapján kiválasztott, egykópiás génhez (*Bzip3*) viszonyítottuk a transzgénikus vonalon kapott amplifikációs ciklusszámot (Ct). Ezeket mintánként átlagoltuk, az aldóz reduktázt túltermelő MsALR_L3 vonalon kapott transzgenre vizsgált átlag Ct értékeket az ugyanazon minták *Bzip3* primerrel kapott átlag ciklusszámához viszonyítottuk (ΔCt), majd a $2^{\Delta Ct}$ módszerrel a kópiaszámot meghatároztuk. Ezen kísérlet alapján a vizsgált MsALR_L3-as vonal kópiaszáma $11,2 \pm 0,8$ -re volt kalkulálható.

A második módszerhez a transzformációhoz használt plazmid DNS és a vizsgált transzgénikus vonalról és a vad típusú vonalról származó genomi DNS-ek keverésének módszerét alkalmaztuk (Song et al. 2002), annak meghatározása végett, hogy a transzformáláshoz használt plazmid molekulából mekkora mennyiségű felel meg 1 plazmid kópia = 1 haploid genom mennyiségnek. Ennek a mennyiségnek (0,03 pg) a meghatározása után elvégeztük a T2 generációjú transzformáns vonal 5 csíranövényén a relatív kópiaszám meghatározását. A Ct értékek meghatározása után a $2^{\Delta Ct}$ módszerrel számolva megkaptuk a relatív kópiaszámokat. Ezen módszer alapján a vizsgált MsALR_L3 transzgénikus vonalunk tesztelt homozigóta egyedei a T2 generációban egyaránt $14,9 \pm 2$ kópiaszámban hordozták a vizsgált MsALR transzgént.

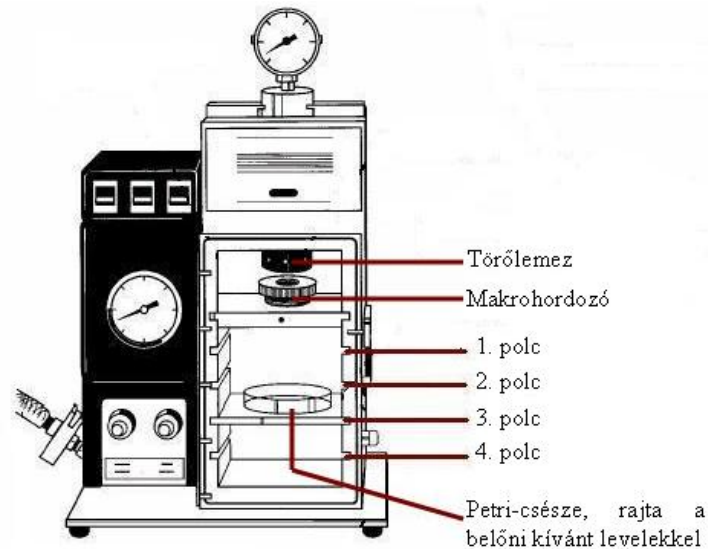
4.3. Az MsALR fehérjét termelő árpa vonalak stressztűrő képességének fluoreszcencia detekciós módszeren alapuló vizsgálatának optimalizálása

Az általunk alkalmazott tranziens expressziós tesztrendszer a Marzin et al. (2008) közleményében leírt rendszer továbbfejlesztésén alapul. Lényege, hogy a kontroll Golden

Promise fajta és az MsALR fehérjét termelő transzgenikus árpa növények levélmintáit (MsALR_L3 vonal) a génbelövés módszerét alkalmazva tranziensen is transzformáljuk.

Az árpalevelek részecskebelövő berendezéssel történő minél nagyobb hatékonyságú tranziens transzformálása érdekében a kezdeti kísérletek során szükség volt a berendezés bizonyos paramétereinek átállítására, ugyanis az alapbeállítási protokollt követve az első próbálkozások során megszámlolt GFP-t termelő sejtek száma és a levélfelületen való eloszlása nem bizonyult megfelelőnek. A megoldás végett először stressz kezelés nélküli Golden Promise leveleken kísérleteztünk. A beállítások során az alábbi kísérleti körülményeket változtattuk:

- a leveleket tartalmazó Petri-csészék nagyságát (9 cm, vagy 6 cm átmérő, Greiner), illetve a levelek lemezen belüli egymáshoz viszonyított távolságát,
- a törőlemez és a makrohordozó egymástól viszonyított távolságát,
- a makrohordozó és a leveleket tartalmazó Petri-csészék egymáshoz viszonyított távolságát (különböző polcokon végzett belövések),
- a belövések számát (1x vagy 2x belövés),
- illetve a makrohordozóra egyszerre felvitt aranyzemcsék mennyiségét.

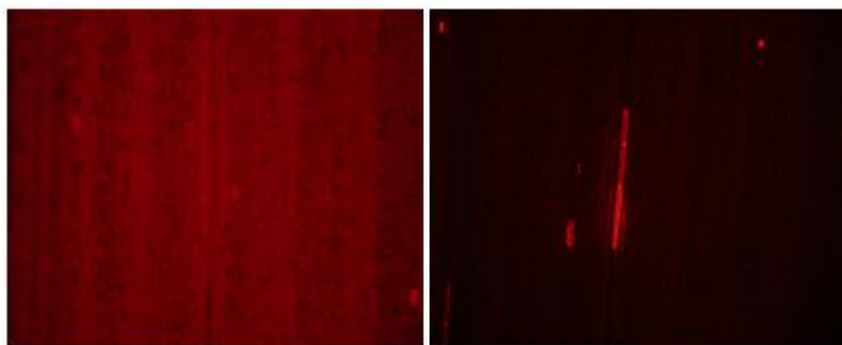


14. ábra: Részecskebelövő berendezés alkatrészei és beállítási lehetőségei
(Forrás: <http://www.oocities.org/eurekayao/bombgene.html> ábrája alapján újrarajzolva)

A nagyobb (d= 9 cm) Petri-csészékben végzett kísérletek semmilyen más átállítási lehetőséggel együtt sem biztosítottak elegendő számú és egyenletes eloszlású GFP expresszáló epidermisz sejtet a levágott leveleken, hiszen még a legoptimálisabb körülmények esetén is csak a középső levelek középső harmadában tudunk zölden fluoreszkáló sejteket megszámlolni, ezeknek a leveleknek a végei és szélső levelek mindig érintetlenek maradtak. Elsőként tehát elvetettük az ilyen méretű Petri-csészékkel való próbálkozások lehetőségét, s a továbbiakban szintén nem foglalkoztunk a levágott levelek egymáshoz viszonyított távolságának

megváltoztatásával sem, hiszen egységnyi (5db) levélszegmenseket kisebb átmérőjű (6 cm) Petri-csészében csak szorosan egymás mellett tudunk csak elhelyezni. Legelső változtatási pontként ezért a kisebb, 6 cm átmérőjű Petri-csészéket használtuk, s itt vizsgáltuk a legeredményesebb beállításokat. Hasonlóan nem vezetett eredményre, ha a kisebb Petri-csészén lévő levelekkel és a makrohordozótól távolabb – vagyis az általunk alkalmazott részecskebelövő berendezés (14. ábra) harmadik vagy negyedik polcán – lévő lemezeken próbáltunk elegendő számú sejtet transzformálni. A próbált első vagy második polcon végzett belövések közül egyszeres mennyiségű (azaz $1 \times 5 \mu\text{g}$) plazmid alkalmazása esetén is a második polcon végzett belövések bizonyultak a leghatékonyabbaknak, itt volt optimális a teljes Petri-csészén belüli és a levelek felszínén nézett eloszlás. A még nagyobb számú expresszálo sejtek elérése érdekében próbát tettünk arra, hogy a DNS-oldatot az elkészítését követően, a makrohordozóra egyszeres ($5 \mu\text{l}$), vagy kétszeres mennyiségben mért ($2 \times 5 \mu\text{l}$) plazmid, vagy az egyszeres mennyiségben mért, de egymás után egyszer, vagy egymás után kétszer belőtt leveleken tudunk-e magasabb számú GFP-t termelő sejtet megszámolni. Tekintettel arra, hogy a belövés is egyfajta stresszként érinti a leveleket, próbáltuk úgy kiválasztani az összeállítást, amely kiértékelés szempontjából is megfelelő (a stressz kezelés statisztikai hatását elemezve szignifikáns változást mutat) és mindemellett a 4 napos stressz végén is érdemben tudunk expresszálo sejteket megszámolni. Az optimális összeállításnak a második polcra elhelyezett Petri-csészék belövése bizonyult, a makrohordozóra kétszeresen felvitt DNS mennyiséggel ($2 \times 5 \mu\text{g}$).

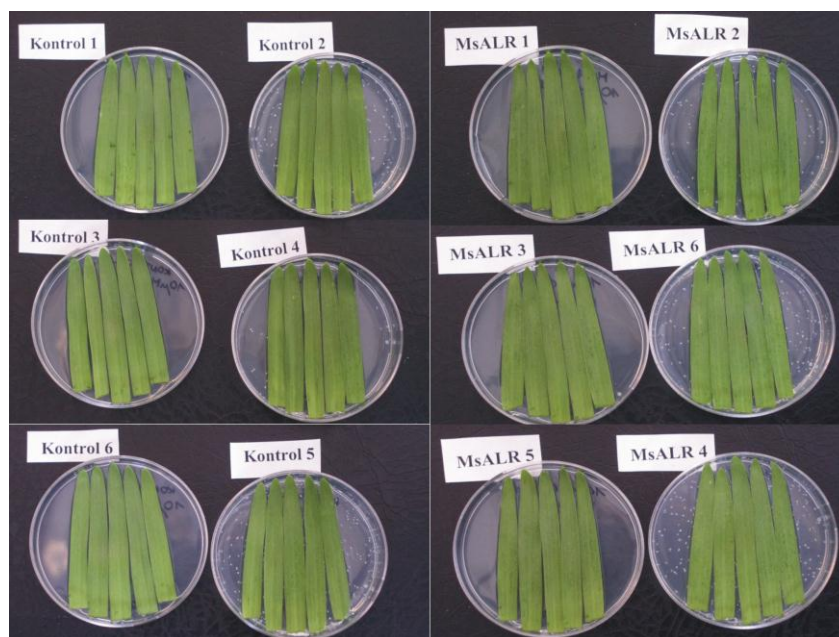
Amint a transzformált sejtek megfelelő arányban oszlottak a Petri-csészékbe helyezett levélszegmensek teljes felületén, kipróbáltuk a GFP/DsRED kettős transzformációját is. Itt a mikroszkópos detektálás folyamán azzal szembesültünk, hogy a meglévő szűrőberendezés az eltérő erősséggel expresszálo DsRED transzformáns sejtek miatt nem alkalmas a vörös fluoreszcens sejtek és klorofill autofluoreszcencia teljes biztonsággal történő elkülönítésére és így a DsRED sejtek korrekt mennyiségi meghatározásra, ezért a további kísérletekhez a hatékonyabb detektálás érdekében megfelelő mikroszkóp szűrőlemezt szereztünk be.



15. ábra: DsRED expresszálo epidermisz sejtek detektálása mikroszkóp szűrőlemez beszerzése előtt (A) és után (B).

Miután a DsRed sejtek mikroszkópos detektálása is megfelelőnek bizonyult, a korábbi Western-blot eredményére hagyatkozva kiválasztottunk egy magas expressziós szinttel jellemezhető transzgenikus vonalat (13. ábra, MsALR_L3-es vonal) és kipróbáltuk a GFP/DsRED kettős transzformációját is.

A levágott leveleket fitoagar táptalajra helyeztük, génbelövással tranziensen transzformáltuk, majd a belövést követően 24 óráig, nem stresszelt körülmények között hagytuk felhalmozódni a zölden fluoreszkáló GFP és az éretlen, nem fluoreszkáló DsRED fehérjét, Parafilm®-mel lezárt Petri-csészékben, klimatizált helyiségben (24 °C állandó hőmérsékleten, nem közvetlen megvilágítással). Egy nap elteltével fluoreszcens sztereo mikroszkóp alatt megszámloltuk a GFP expresszáló epidermisz sejtek számát.



16. ábra: Részecskebelövésen átesett levelek a belövést követő 1 nap elteltével, a GFP expresszáló sejtek mikroszkópos számlálását megelőzően. Kontroll: Golden Promise árpafajta levelei, MsALR: transzgenikus vonal levelei.

4.3.1. A citoszólban felhalmozott MsALR fehérje hatása a transzgenikus árpa szárazság, só és direkt karbonil stresszre adott válaszreakcióiban

A GFP-expresszáló sejtek számolása után a belőtt levélszegmenseken kísérletenként különböző stressz kezeléseket hajtottunk végre.

Első kísérletként a levélszegmensek 50 %-át *dehidratációs stressznek* tettük ki az Anyag és módszer fejezetben részletezett eljárásoknak megfelelően. A stressz kezelés 4 napos időtartamának végeztével megszámloltuk a levélszegmenseken vörös fluoreszkáló epidermisz

sejteket, s ezek számát normalizáltuk a belövést követően, stressz kezelés nélkül felhalmozódni hagyott zöld fluoreszcens sejtek számával (*Mellékletek, M5./1., 2. fénykép*).

A nem stresszelt, fitoagaron tartott leveleken minden esetben csak mérsékelt változást találtunk a számolt GFP/DsRED értékekben, mind a vad típusú Golden Promise, mind pedig a transzgenikus MsALR vonalunk között.

A szárazság stresszelt levelek esetében azonban szignifikáns különbség mutatkozott a stresszelt transzgenikus vonal javára (17./ A ábra). Itt ugyanis 22 %-kal több DsRED expresszázó sejtet sikerült megszámolnunk a stresszkezelés utolsó napján (86%) a szintén stresszkezelésen átesett Golden Promise levelekhez viszonyítva (64%). Mindez arra utalt, hogy a DsRED expresszázó sejtek normalizált száma alkalmas paraméter a levelek dehidratáció, vagy más stresszekkel szembeni ellenálló képességének vizsgálatára.

Következő lépésként magas ozmotikus stresszt és oxidatív stresszt okozó *sóstressz* (175 mM NaCl) kísérletet is végeztünk. Azért volt szükséges ilyen nagy sókoncentrációt alkalmazni, mert a nem transzgenikus Golden Promise fajta eredetileg is magas sótűrő (Forster et al. 2001) képességgel rendelkezik. A tranzienstrendszerben alkalmazott 4 napos stresszkezelés alacsonyabb (150 mM) sókoncentráció esetén nem okozott érzékelhető változást, és a GFP/DsRED fluoreszcencia változás sem mutatott szignifikáns különbségeket. Ennél magasabb, 200 és 250 mM NaCl-ot tartalmazó táptalajon azonban az árpa levelek a génbelövés szövetroncsoló stresszhatásával kiegészülve négy napos inkubálás alatt már teljesen elsárgultak, a fluoreszcencia mérése gyakorlatilag teljesen lehetetlenné vált. Ezért döntöttünk a 175 mM NaCl-ot tartalmazó táptalajok alkalmazása mellett a további kísérletekben.

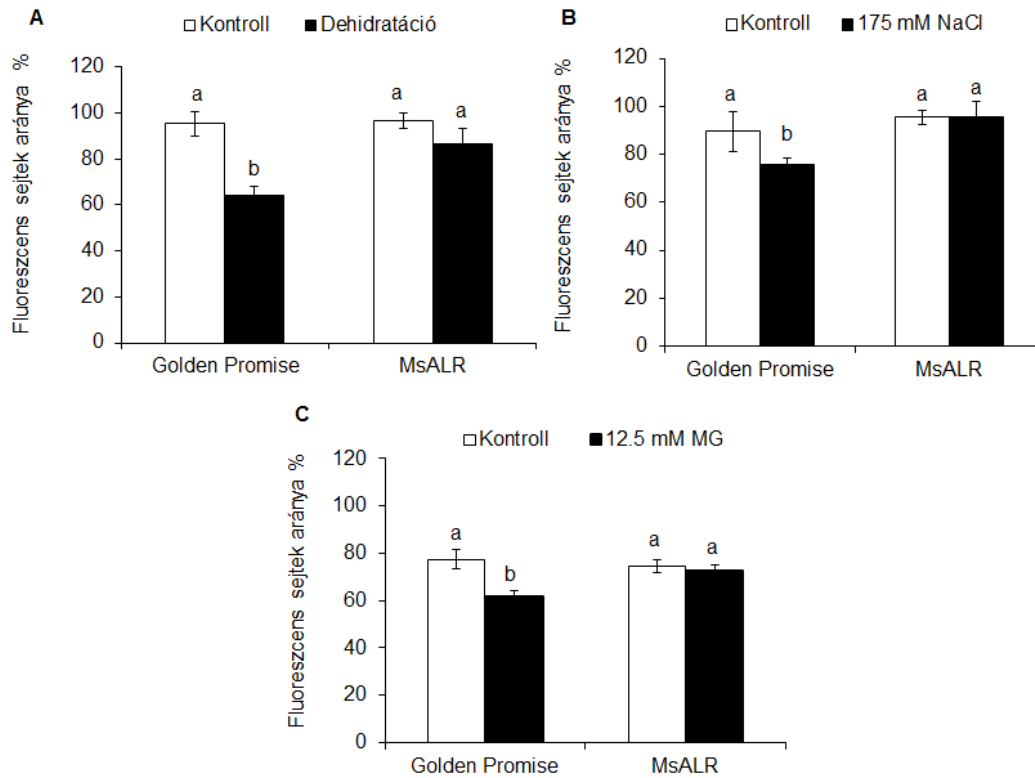
A sóstressz kezelésekre eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a lucerna aldóz redukáz enzim túltermelése az alkalmazott stressz körülményei között hasonló védelmet biztosít, mint a szárazság stressz esetében. A GFP/DsRED fluoreszcens sejtarány változásában a sóstressz kezelt transzgenikus leveleken szinte ugyanannyi DsRED expresszázó sejtet detektáltunk, mint a fitoagaron tartott transzgenikus levelek esetében (95.6 %). Ezzel szemben a vad típusú, só stresszel kezelt Golden Promise leveleken 20 % -kal kevesebb (75,9 %) DsRed expresszázó sejtet mértünk a fitoagaron tartott vad típusú, kontroll levelekhez képest (95,7 %) (17./ B ábra).

A kiválasztott transzgenikus vonalunk levelein metilglioxál (MG) kezeléssel kiváltott direkt *karbonil stressz* kezelést is végrehajtottunk. A MG stresszkezelések során alkalmazandó koncentrációt is előkísérletek segítségével határoztuk meg. A részecskebelövés nélkül különböző MG koncentrációjú táptalajokra helyezett vad típusú Golden Promise leveleken a 4 napos stressz kezeléseket követően azt tapasztaltuk, hogy az elsődlegesen kiválasztott, kiindulási 5 mM MG kezelés nem okozott szembetűnő változást a levelek klorofill tartalmában. A magasabbik koncentrációérték, a 20 mM MG koncentrációt nézve viszont már számottevően erős változások

(nekrózis) voltak megfigyelhetőek a negyedik nap végére, nemcsak a levelek vágási felületénél, hanem az egész levélfelületen, ami arra engedett következtetni – hasonlóan a só stressz kísérletekhez -, a hogy részecskebelövés stressz hatásával együtt nagy valószínűséggel már alkalmatlannak bizonyulna a fluoreszkáló sejtek számlálásához.

Ezért, a feltehetően az 5 - 15 mM közötti tartományba eső koncentráció pontos kiválasztása végett részecskebelövással együtt is megvizsgáltuk az adott koncentrációértékeket, amely kísérletek során mértük mind a fluoreszkáló sejtek számát, mind pedig a stressz kísérlet végére okozott klorofill tartalomban bekövetkező változást. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az 5 mM MG kezelés az előzőeknek megfelelően nemcsak a klorofill tartalomban, de a fluoreszcens sejtek arányában sem okozott változást a stressz 4 napos időtartama alatt. A 7,5 és 10 mM MG -al végzett mérések esetében a stresszelt levélszegmenseken mért eredmények szórását tekintve nem voltak szignifikánsnak tekinthetőek egymáshoz, illetve a fitoagaron tartott levelekhez képest, sem klorofill tartalom változásában, sem pedig a fluoreszcens sejtek arányában. A 12,5 mM koncentráció azonban már kellően erős, szignifikáns változást eredményezett mind a kettő vizsgált paraméter esetében. Ezért választottuk ezen koncentrációt, s a kísérletet végrehajtottuk nemcsak a vad típusú Golden Promise, hanem az MsALR_L3 transzformáns, előzőekben is tesztelt vonalunkon.

A GFP/DsRED fluoreszcens arány vizsgálata során ennél a stressznél is, az eddigi kiszáritás és só stressz kezelésekhöz hasonlóan szignifikáns különbség mutatkozott a stresszkezelt aldóz reduktáz túltermelő növényekről gyűjtött leveleken mért eredményekben a vad típusú Golden Promise stresszelt levélszegmensein mért értékekhez képest, míg a fitoagaron tartott levelek között továbbra sem mutatkozott szignifikáns eltérés (17./ C ábra). A vad típusú leveleken detektált DsRED expresszáló sejtek a kezelés végére (61,5%) mintegy 15 % -os csökkenést mutattak a fitoagaron tartott kontroll levelekhez képest (77,3 %), míg a transzgenikus vonalról származó leveleken ez az érték a MG kezelés ellenére is alig változott (74,4 % kontroll állapotban, 72,7% stresszkezelés után).



17. ábra: A tranziensteszrendszerben vizsgált fluoreszcens sejtek arányának változása a termelt fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgenikus vonalon végzett stresszkezelések hatására. A nem stresszelt, fitoagaron tartott (kontroll) és a dehidratációval (A), 175 mM NaCl-al (B) és 12,5 mM MG-lal (C) stresszelt vad típusú Golden Promise és az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó MsALR_L3 vonal transzgenikus növényeiről származó levélszegmenseken mért GFP/DsRED arány alakulása a kísérlet utolsó napján. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

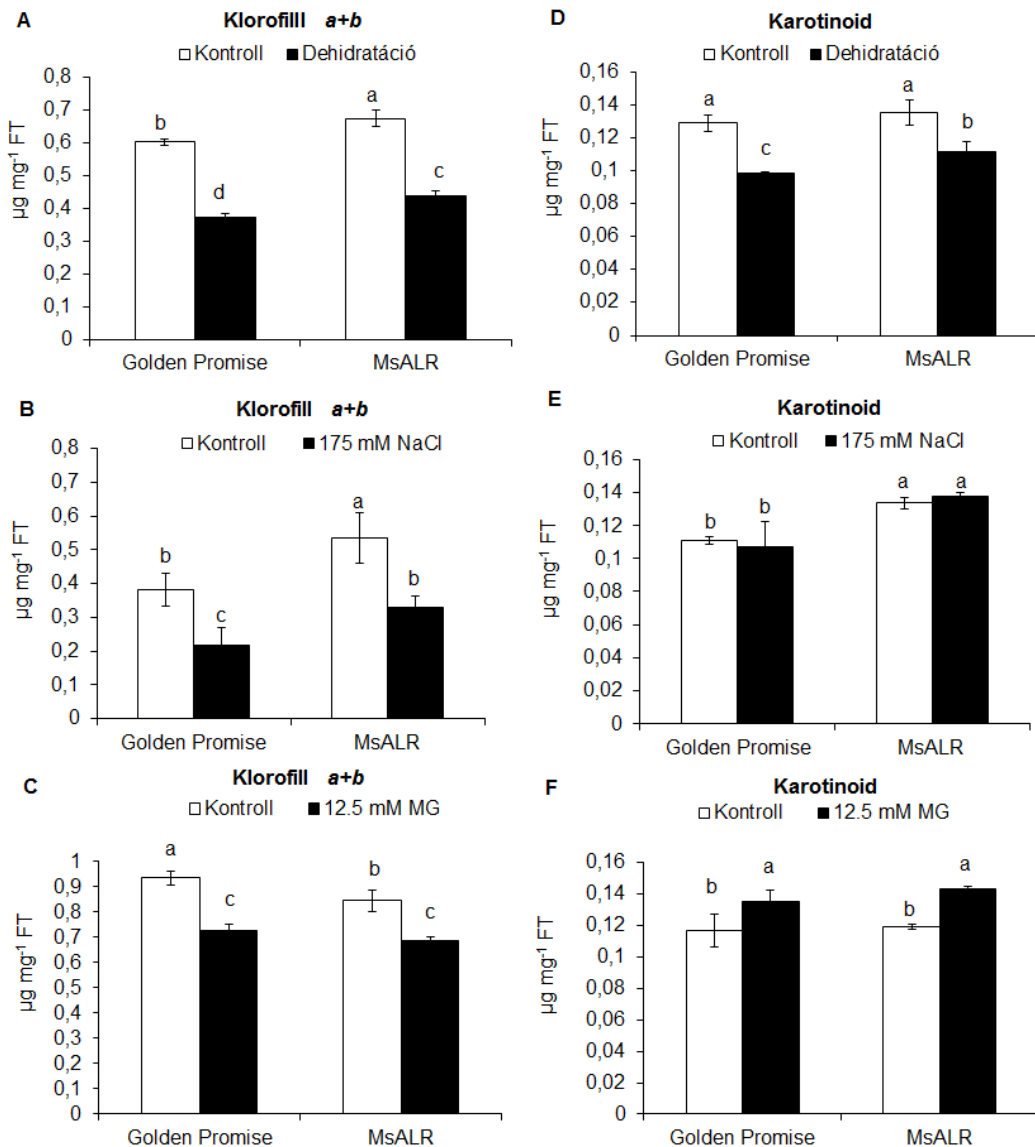
4.3.1.1. A fotoszintetikus pigment tartalom változása

A levelekben mért klorofill és karotinoid tartalom a növényi sejtek fontos stresszérzékeny paramétere, ezért a vad típusú és az MsALR_L3 transzgenikus vonal stressz tűrése közötti különbséget fotoszintetikus pigment tartalom mérésekkel is alátámasztottuk.

Dehidratációs stresszkezelés után arra az eredményre jutottunk, hogy mind az összklorofill (klorofill a+b), mind pedig a karotinoid tartalomban szignifikáns különbségeket találtunk a Golden Promise és a transzgenikus; az MsALR fehérjét túltermelő árpák között. Az aldóz redukáz fehérjét túltermelő transzgenikus vonalakon elvárásainknak megfelelően, magasabb klorofill és karotinoid szintet mértünk a vad típusú növényekhez viszonyítva, már stressz kezelés nélküli, fitoagar táptalajon tartott állapotban is, valamint a dehidratációs stressz kezelés végeztével mért klorofill és karotinoid tartalomban is. Az összes dehidratációs stresszkezelés során a transzgenikus MsALR_L3 vonalunkban szignifikánsan több klorofill volt mérhető (18./ A,D ábra).

Sóstressz kezelést követően a klorofill tartalom változása, illetve ennek különbsége a transzgenikus és a vad típusú növények esetében is hasonló volt a szárazság stressz során mért értékekhez, a transzgenikus növényben a kísérlet végeztével itt is szignifikánsan több klorofillt mértünk. Ez érvényes volt a stresszmentes állapotra is, hasonlóan az előző kísérletekben tapasztaltakhoz. Szintén jelentős változást mértünk a karotinoidok mennyiségében is, ugyanis míg a szárazság stressz esetén a karotinoid tartalom jelentősen csökkent, addig a só stressz során ez az érték gyakorlatilag nem változott. Ennek magyarázataként az szolgálhat, hogy a só stressz kiválasztott körülményei között a növények még képesek voltak elegendő karotinoid bioszintézisére, mely segítségével hatásosan védték a fotoszintetikus apparátus fehérjéit a reaktív gyökök támadásával szemben (nem fotokémiai kioltás-NPQ)(18./ B, E ábra).

MG kezelést követően a fotoszintetikus pigment tartalom változásainak mérése során a sóstressz kísérletek alkalmával mért értékekhez hasonlóakat tapasztaltunk. Az összklorofill tartalom mérése során a *MG* stressz kezelésen átesett vonalak levelei a fitoagaron tartott levelekhez viszonyított százalékos klorofill csökkenésben mutatkozott kisebb változás a transzgenikus vonal javára: az MsALR_L3-as transzgenikus vonalról származó levélszegmensek esetében csak 20 % -os klorofill tartalom csökkenés volt kimutatható, addig a vad típusú Golden Promise esetében ez az érték 25 % -ra volt tehető (átlagértékekkel számolva). A karotinoid tartalomban ehhez képest nem detektáltunk semmilyen különbséget a vad típus és a transzgenikus vonalon mért értékek között, viszont a karotinoid tartalomban mindkettő vizsgált vonal esetében növekedés volt tapasztalható a kiindulási, fitoagaron tartott állapothoz képest, melynek valószínűsíthető oka, hogy a *MG* kezelés során is képesek voltak elegendő karotinoid bioszintézisére, mellyel szintén hatásosan védték a fotokémiai rendszer fehérjéit (nem fotokémiai kioltás) (18./ C, F ábra).



18. ábra: A termelt fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgenikus vonalon (MsALR) és vad típusú Golden Promise fajta levelein mért fotoszintetikus pigment (klorofill a+b és karotinoid) tartalom alakulása dehidratáció (A, D) sóstressz (B, E) és karbonil (C, F) stressz hatására. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

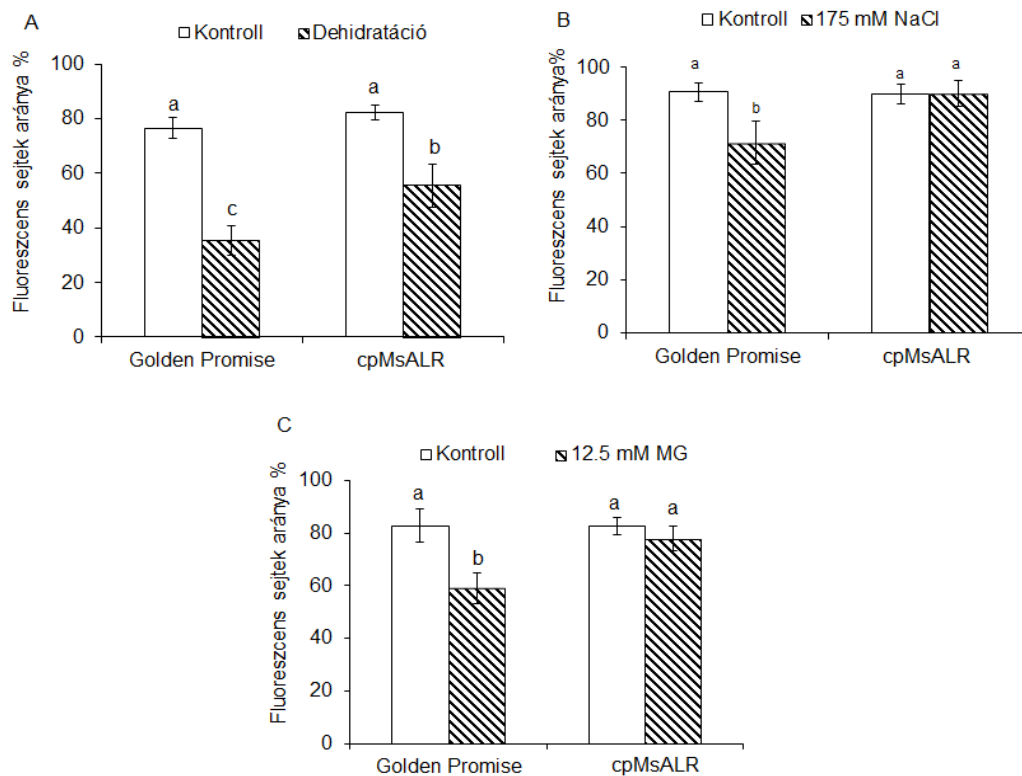
4.3.2. A kloroplasztisban felhalmozott MsALR fehérje hatása a transzgenikus árpa szárazság, só és direkt karbonil stresszre adott válaszreakcióiban

Az MsALR fehérjét a citoplazmában felhalmozó transzgenikus növények létrehozása mellett az alkalmazott transzformációs vektorrendszer lehetőséget nyújtott arra is, hogy a termelt fehérje lokalizációját is megváltoztassuk, ezáltal a kiválasztott és stabil transzformációhoz használt génelőltünk termékét a kloroplasztisba irányítsuk. A transzformációs eredményként kapott növényekben bizonyítottuk a kloroplasztisban történő MsALR felhalmozást (13. ábra), melynek során kiválasztott transzgenikus növények (cpMsALR_L1) utódgenerációját

felszaporítva elegendő anyagot kaptunk egy kiválasztott kloroplasztisz transzformáns vonal tranziens expressziós tesztrendszerben történő vizsgálásához.

A GFP/DsRED módszerrel kapott eredmények bebizonyították, hogy a kloroplasztiszban akkumulálódó aldóz redukáz fehérje legalább akkora védőhatást fejtett ki a szárazság stressz során, mint a citoszólban felhalmozódó. A negyedik napon mért és normalizált fluoreszcens sejtek aránya itt is szignifikáns különbséget mutatott a transzformáns vonalunk javára a vad típusú Golden Promise-hoz képest (19./A ábra): a stressz kezelésen átesett transzgenikus levelek 20 % -al több (55,47 %) fluoreszcens sejtarányt mutattak, mint a dehidratált Golden Promise levelek (35,37 %)

A GFP/DsRED arány nem változott számottevően a só és MG kezeléseket követően: a cpMsALR transzgenikus vonal levelei a stresszkezelés nélküli, kontroll transzgenikus leveleken mértékkel azonos eredményeket mutattak: 90.1 % a 175 mM NaCl és 77.9 % a 12.5 mM MG stresszelt cpMsALR leveleken, valamint 89.6 % és 82.8 % a stressz kezelés-mentes kontroll transzgenikus leveleken. Összehasonlításképpen a só és MG stresszelt Golden Promise leveleken mért fluoreszcens sejtarány szignifikánsabban alacsonyabb volt a transzgenikus leveleken mértékekhez képest (71.5 % a 175 mM NaCl stressz és 59.01% a 12.5 mM MG stressz kezelései kísérletekben)(19./ B, C ábra).



19. ábra: A tranziens tesztrendszerben vizsgált fluoreszcens sejtek arányának változása a termelt fehérjét a kloroplasztiszban felhalmozó transzgenikus vonalon végzett stresszkezelések hatására. A nem stresszelt, fitoagaron tartott (kontroll) és a dehidratációval (A), 175 mM NaCl-al (B) és 12,5 mM MG-lal (C) stresszelt vad típusú Golden Promise és az MsALR fehérjét a kloroplasztiszban felhalmozó cpMsALR vonal transzgenikus növényeiről származó

levélszegmenseken mért GFP/DsRED arány alakulása a kísérlet utolsó napján. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

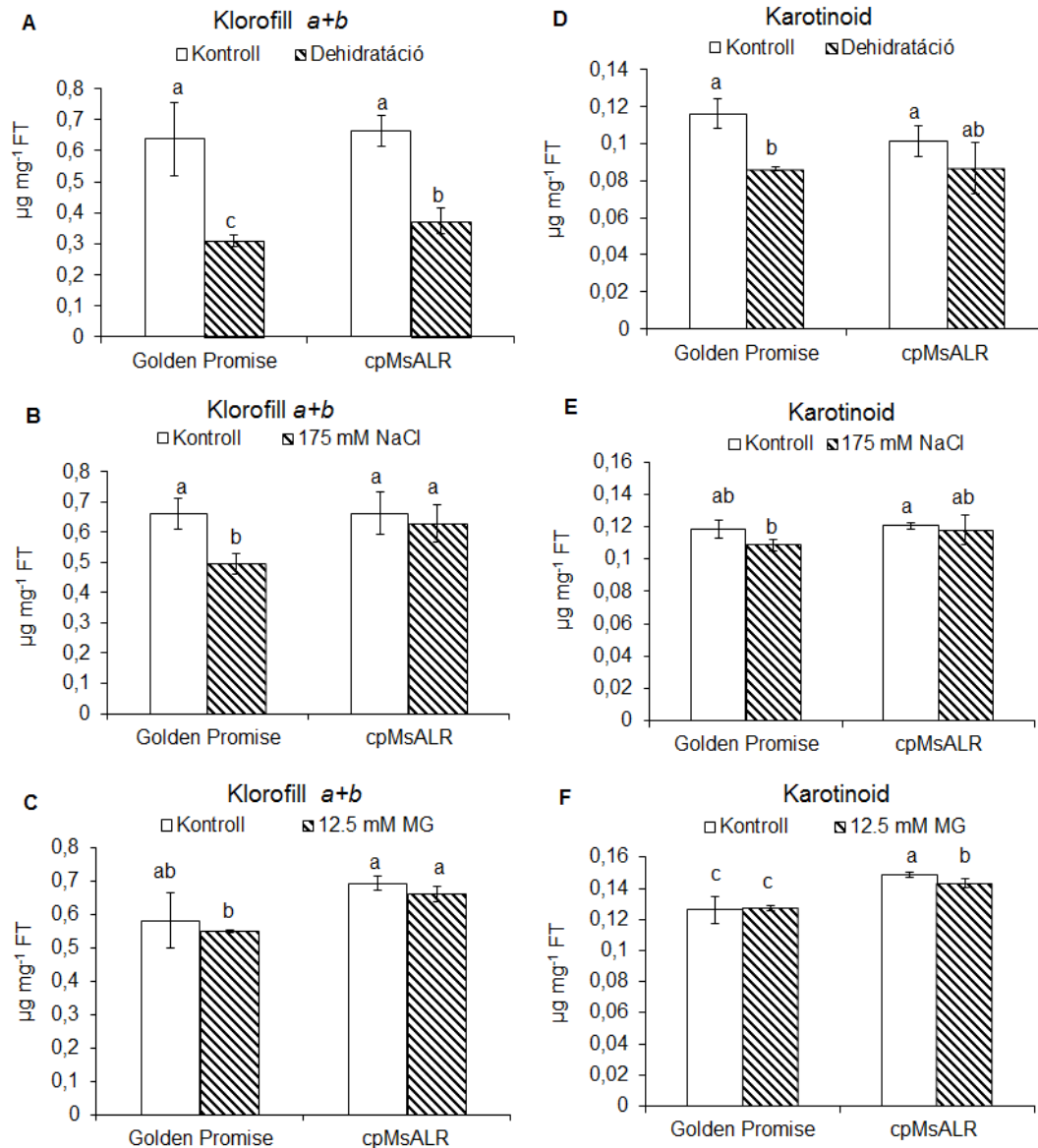
4.3.2.1. Fotoszintetikus pigment tartalom változása

A termelt fehérjét a kloroplasztiszban felhalmozó transzgenikus vonalak tesztelése során - az aldóz reduktáz fehérjét a citoszólban felhalmozó transzformáns növényeken végzett kísérletekhez hasonlóan – a fotoszintetikus pigment tartalom változását is nyomon követtük.

A *dehidratációs stressz* kezelés végeztével a stresszelt transzgenikus árpa vonal levelei itt is szignifikánsan magasabb összklorofill tartalmat mutattak a kísérlet utolsó napján, a vad típusú Golden Promise -hoz képest: ez 7,9 % -al magasabb klorofill tartalmat jelentett (átlagértékekkel számolva). Ezzel ellentétben a karotinoid tartalom változásai nem követték ezt a tendenciát. A százalékos karotinoid tartalom csökkenés tekintetében a transzformáns vonal 15 % -os karotinoid tartalom csökkenést mutatott, míg a vad típusú Golden Promise-nál 25 % -os karotinoid tartalom csökkenés volt megfigyelhető a fitoagaron tartott levelekhez mérve (átlagértékekkel számolva) (20./A, D ábra).

A *sóstresszt* követően a transzgenikus cpMsALR_L1 vonal levelei csak 4,9 % -os csökkenést mutattak a klorofill tartalom tekintetében a kontroll állapotokhoz viszonyítva, szemben a vad típusú levelek 25 %-os összklorofill tartalom csökkenésével. A karotinoid tartalom változásai ehhez hasonló tendenciát mutattak, a stressz kezelésen átesett transzgenikus levelek 2,4 %-kal kevesebb karotinoid tartalommal voltak jellemezhetőek, míg a vad típusú levelekben ez a csökkenés 11,8 % -os volt (20./ B, E ábra).

Karbonil stressz kísérletekben a transzgenikus növények már kiindulási állapotban is szignifikánsan több klorofill és karotinoid tartalommal voltak jellemezhetőek a vad típusú levelekhez képest, ez a különbség a stresszkezelés végeztével is érzékelhető volt (20./C, F ábra).



20. ábra: A termelt fehérjét a kloroplasztiszban felhalmozó transzgenikus vonalon (cpMsALR) és vad típusú Golden Promise fajta levelein mért fotoszintetikus pigment (klorofill a+b és karotinoid) tartalom alakulása dehidratáció (A,D) sóstressz (B, E) és karbonil (C, F) stressz hatására. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

4.4. Az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgenikus vonalon mért prolin és tiobarbitúrsav reaktív származékok felhalmozódásának mértéke az alkalmazott stresszhatásokra

A vízvesztéssel szembeni védekező mechanizmusok egyik fajtája a különböző szerves ozmolitok (pl. prolin) sejten belüli felhalmozódása. Az aldóz reduktáz enzimek ozmoregulációban betöltött szerepe irodalmi adatok alapján is bizonyított (Oberschall et al. 2000), ezért a fluoreszcens sejtek aránya, valamint a fotoszintetikus pigment tartalom mérése

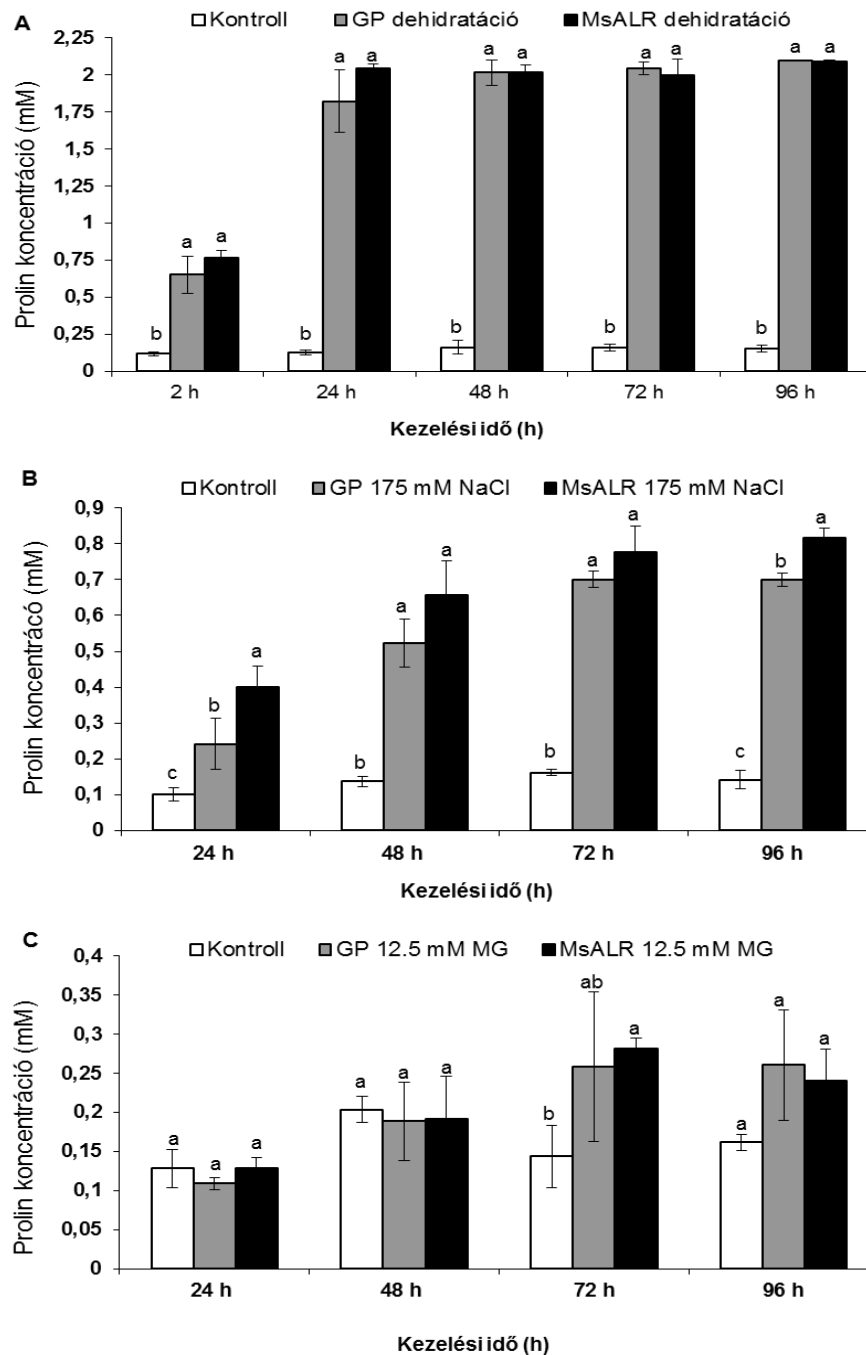
után megvizsgáltuk, vajon a túltermeltetett MsALR fehérje védő hatása a prolin felhalmozódás szabályozásában megnyilvánul-e? (21. ábra).

A kezelés nélküli, közvetlenül a cserépről levágott vad típusú Golden Promise és MsALR transzformáns vonal levelei 0,12 mM szabad prolint tartalmaztak, melynek mennyisége a *kiszáritás* 2 órás időtartamának végére mintegy 5-6 szorosára nőtt. A fitoagaron tartott leveleken mért prolin szint, mind a vad típus, mind az MsALR vonal esetében a kísérlet teljes időtartama alatt a kezeletlen, levágáskori érték (0,12 mM) körül maradt, mely alátámasztotta azt is, hogy a kísérleti rendszer elvárásainknak megfelelően működött, a fitoagaron tartott levelek a frissen levágott levelekhez képest nem voltak további stresszhatásnak kitéve. Az első napon szedett dehidratált minták szabad prolin szintjében a kiindulási, kezelés nélküli mintákban mért prolin szinthez képest a vad típusú Golden Promise esetében 15-szörös, a transzgénikus leveleink esetében pedig 16-szoros emelkedés volt tapasztalható. A transzgénikus növényről származó kiszáritott levelek esetében a felhalmozott szabad prolin szint hamarabb, már az első napon elérte a kísérlet végén is mért maximális szintet, azaz a transzformáns vonal gyorsabb prolin felhalmozó képességet mutatott. Ezzel ellentétben a kiszáritott Golden Promise leveleken mért szabad prolin szint enyhe emelkedést mutatott a naponkénti minták esetében, egészen a negyedik napon mért maximális szint eléréséig (2,09 mM) (21./A ábra).

Só stressz során a levelekben mérhető szabad prolin szintek meghatározása az elvárásoknak megfelelő eredményeket mutattak. A kezeletlen leveleken az előző kísérletekhez képest kisebb, 0,05 mM prolin koncentrációt határoztunk meg (21. ábra). Ez az eltérés utalt egyrészt arra, hogy az üvegházi nevelés, bár kontrollált keretek között történt, a külső időjárási változékonyságból adódóan mégis lehettek minimális - különbségek az egymáshoz viszonyított kísérletekből szedett levélminták között. A dehidratációs stresszhez hasonlóan a fitoagaron tartott levélminták a kiindulási naptól kezdve, egészen a negyedik napig bezárólag itt is egyforma koncentrációjú prolin szintet mutattak, mind a vad típusú Golden Promise, mind pedig a transzgénikus vonalunk esetében. A dehidratációs stresszel ellentétben a só stressz kísérletek során mért maximális prolin koncentrációt mindkét vizsgált vonalunk csak a negyedik napon, a kísérlet végére, naponként egyenletesen növekvő tendenciát mutatva érte el, de a prolin koncentrációnak ez a maximális értéke sem ért el olyan magas szintet, mint a dehidratáció során. Itt maximálisan 0,8 mM koncentrációban detektáltunk szabad prolint a levágott levelekben. A transzgénikus vonalunknál a termeltetett MsALR fehérje protektív hatása már az első nap végén gyűjtött só stressz kezelt mintákon is látszott, az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgénikus vonalunk ugyanis már ilyenkor szignifikánsan több, 0,4 mM koncentrációjú ozmoprotektív prolint halmozott fel a Golden Promise esetében mért 0,24 mM koncentrációhoz képest, a dehidratációs stressznél vizsgáltakkal megegyezően a transzgénikus vonal itt is

gyorsabb prolin felhalmozó képességet mutatott. Ez a szignifikáns különbség a transzgénikus vonalunk javára mindegyik napon megmaradt a só stresszelt minták esetében (21./B ábra).

Mivel az előző két alkalmazott stressz esetében a levelekben mért szabad prolin mennyisége a stresszhatás jó indikátorának bizonyult, ezért a MG hatásának elemzésekor is kíváncsi voltam ennek a paraméternek a változására. Bár a kémiai stressz esetében a prolin ozmoprotektív hatása nem játszik szerepet a károsító hatás kivédésében, közvetlen reakció lejátszódhat a prolin és a reaktív oxoaldehid között. A szabad prolin szint a kiszáritás, vagy só stressz során kapott eredményeknél alacsonyabb volt. A fitoagaron tartott leveleken mind a kettő vizsgált vonalunk esetében – és az eddig bemutatott mérésekhez hasonlóan – 0,1-0,2 mM szabad prolin szint volt detektálható, kismértékű ingadozást mutatva az első napon szedett mintákhoz képest. A MG stressz kezelésen átesett leveleken mért prolin koncentrációk naponként egyenletesen növekvő tendenciát mutatva változtak, de a kísérlet zárónapján is alig haladták meg a fitoagaron tartott leveleken mért értékeket. Amíg a vad típusú Golden Promise negyedik napon szedett mintája kísérlet zárónapján mintegy másfélszeres prolinszint emelkedést mutatott a fitoagaron tartott levélszegmensekhez képest, addig a transzgénikus növényvonalunk esetében is csak a fitoagaron tartott levelekkel megegyező nagyságú prolin szintet detektáltunk (21./C ábra).



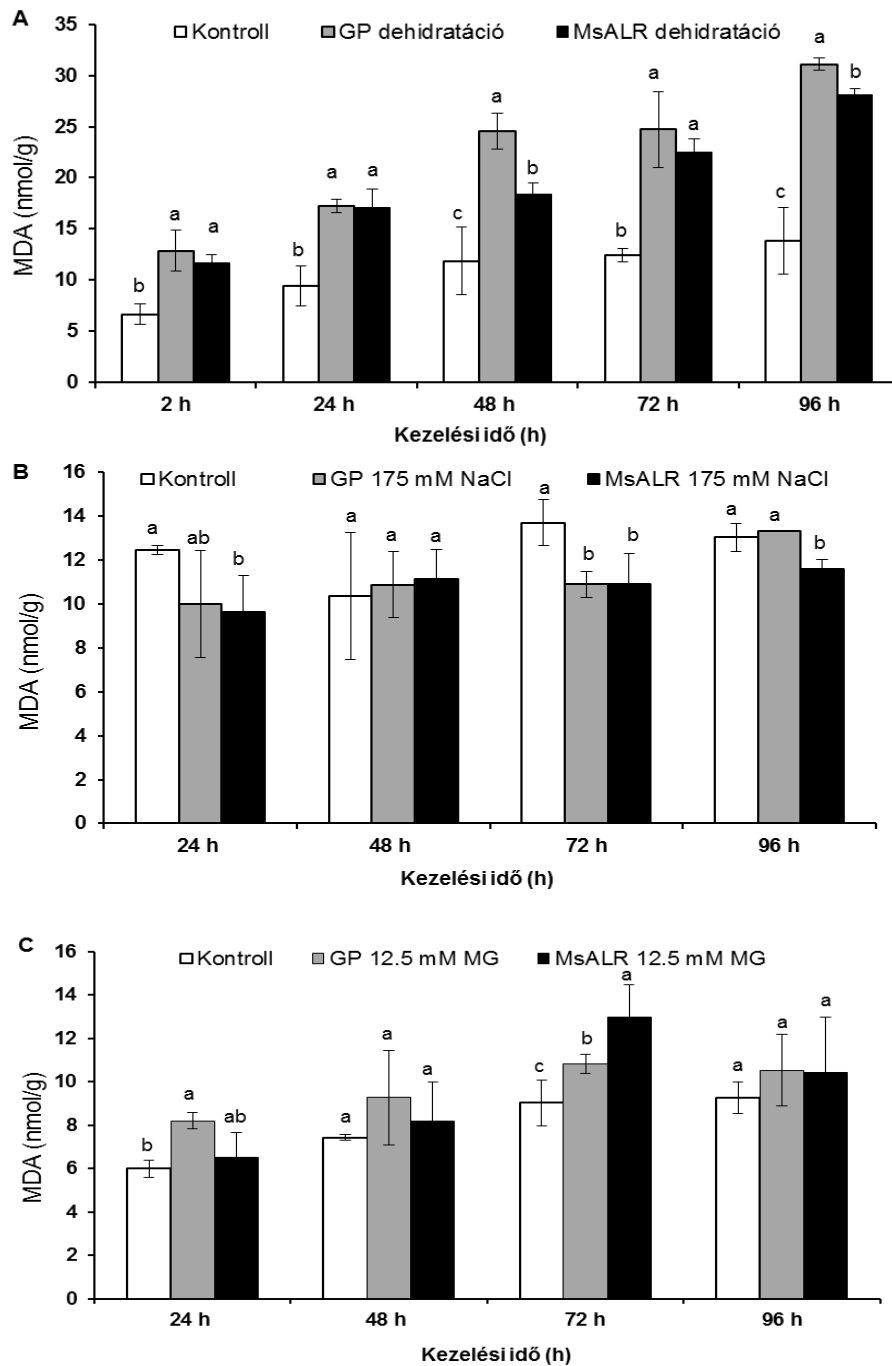
21. ábra: Prolin koncentráció (mM) változása a stresszkezelések időtartama alatt. – a vad típusú Golden Promise fajta és az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgénikus növényekből származó levélszegmensek kiszáritás (A), sóstressz (B) és karbonil (C) stresszkezeléseken átesett levelei. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

A szabad prolin szint meghatározása után további kérdésként felmerült, vajon a megemelkedett stressz tűrő képesség esetén kimutathatóak-e különbségek az alkalmazott stressz károsító hatásainak mértékét jellemző reaktív aldehid komponensek sejten belüli koncentrációjában. A lipid-peroxidáció bomlási termékeinek mérését - ami elsősorban a malondialdehid (MDA) - a tiobarbitursav (TBA) reaktív termékek kimutatásával, az un. TBARS-teszttel határoztuk meg.

A prolin mérésekhez hasonlóan a kezeletlen leveleken itt is egyforma, 7 nmol/gr reaktív aldehid szintet mértünk. A 2 óra *kiszáritás* végezetére mért TBA reaktív aldehid érték ennek közel duplájára, 12 nmol/g-ra nőtt, mind a vad típus, mind a transzgénikus esetében. A naponkénti mintavételek során mért TBA reaktív vegyületek koncentrációja a fitoagaron tartott levelek esetében mindkét vonalnál kismértékben növekvő, de egyforma értékeket mutató tendenciát követett, amely egyben alátámasztotta a prolin méréseknél kapott stresszmentes kísérleti körülményeket is. A dehidratációval stresszelt levelek esetében a második mintaszedési naptól kezdve mutatkozott szignifikáns különbség a transzgénikus vonal javára, a vad típusú Golden Promise-ban ugyanekkor mért 24,5 nmol/g malondialdehiddel szemben az aldóz reduktáz túltermelő vonalunkban csak 18,4 nmol/g lipid peroxidációs bomlási termék keletkezett. Hasonlóan kevesebb reaktív aldehid szintet mértünk a harmadik (22 nmol/g) és a negyedik (28 nmol/g) napon is a transzgénikus vonalunk javára, ezekből pedig arra következtethettünk, hogy a transzformáns árpa növényekben túltermeltetett lucerna aldóz reduktáz fehérje a reaktív aldehid komponensek detoxifikálásával is hozzájárul a növény stressz tűrése képességének fokozásához (22./A ábra).

Sóstesz esetén a lipid-peroxidációs termékek mennyiségének meghatározása során mind a kettő vonal fitoagaron tartott levelein 12-14 nmol/ friss tömeg grammra vonatkoztatott koncentrációban detektáltunk tiobarbitúrsav adduktumokat (csakúgy, mint a korábbi, szárazság stressznek kitett kísérlet során a fitoagaron tartott levelek esetében), ezek az értékek a kísérlet első napjától kezdve az utolsó napig bezáróan ugyanekkora értékeket mutattak. A só stressznek kitett leveleken (a szárazság stressz hatásánál is mértekhez hasonlóan) naponként enyhén emelkedő tendenciát követve, egyre nagyobb mennyiségű TBA reaktív vegyületet mértünk, viszont ennek maximális nagysága a kísérlet zárónapján is csak a fitoagaron tartott leveleken mért értékek érte el, a közbeeső napokon a fitoagaron mért értékekhez viszonyítva kisebb koncentrációkat detektáltunk (22./B ábra).

A MG kezelésnek alávetett leveleken végzett TBARS meghatározása során az MsALR génnel transzformált transzgénikus vonal levelein kevesebb lipid-peroxidációs terméket detektáltunk már a kísérlet első napján stresszelt minták esetében is. A vad típusú Golden Promise vonalról származó levélminták reaktív aldehid szintje magasabb volt nemcsak a stresszelt, de már a fitoagaron tartott levelek esetében is. A kísérlet zárónapján szedett minták esetében mért lipid-peroxidációs termék mennyisége a fitoagaron tartott leveleken mért értékeket alig haladták meg (22./C ábra).



22. ábra: Reaktív karbonil származékok felhalmozódásának üteme a stresszkezelések időtartama alatt. A vad típusú Golden Promise fajta és az MsALR fehérjét a citoszólban felhalmozó transzgenikus növényekből származó levélszegmensek kiszáritás (A), sóstressz (B) és karbonil (C) stressz kezelése. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

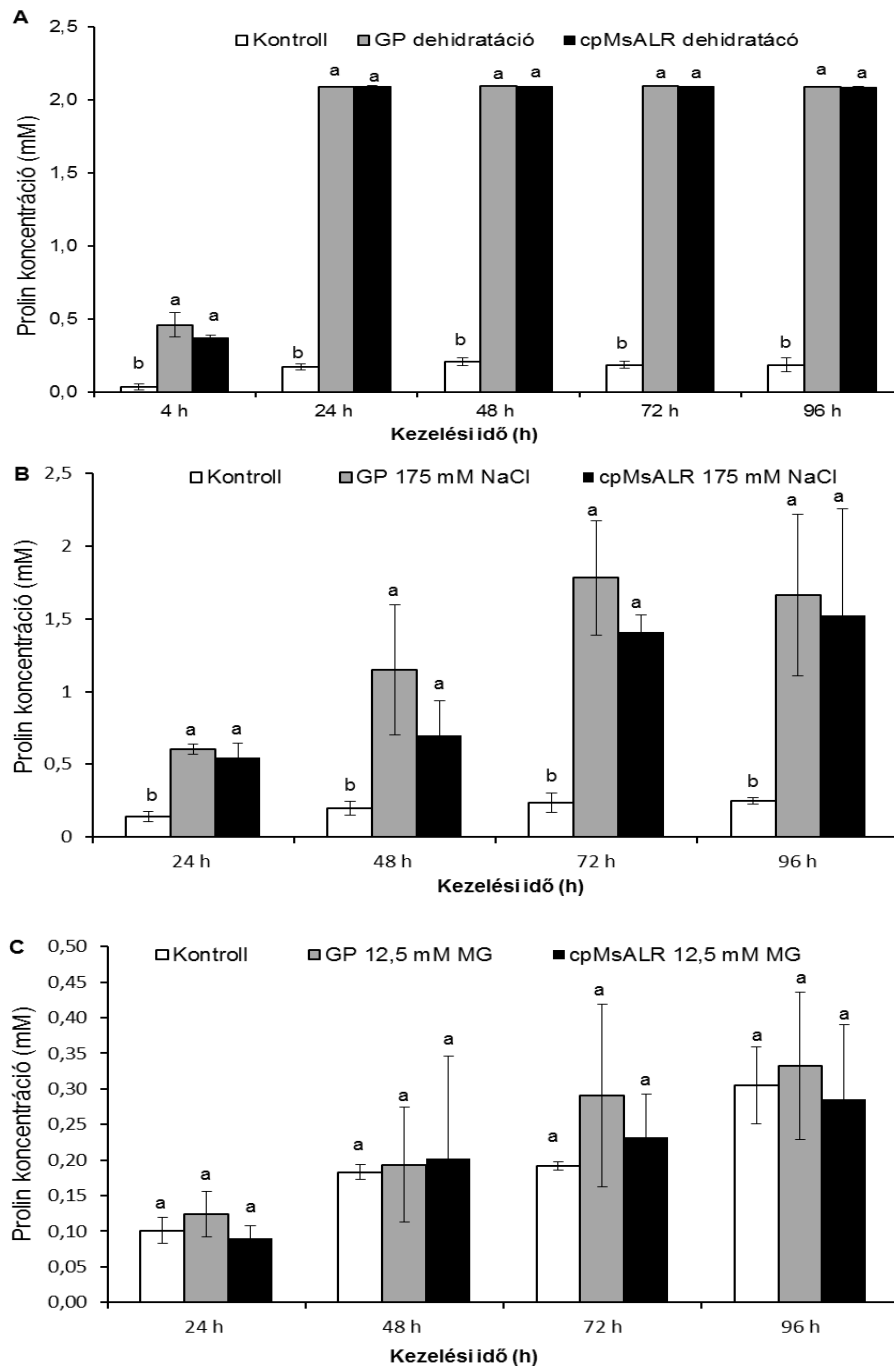
4.5. Prolin és TBARS felhalmozódásának mértéke az MsALR fehérjét a kloroplasztiszban felhalmozó transzgenikus vonalon végzett stresszkísérletek hatására

A kezelés nélküli, közvetlenül a cserépről levágott vad típusú Golden Promise és cpMsALR transzformáns vonal leveleinél továbbra is alacsony szabad prolin szintet mértünk

(0,02 mM). Ez a *kiszáritás* végére mintegy 9-10 szeresére növekedett (0,4-0,5 mM). A fitoagaron tartott leveleken mért prolin szint, mind a vad típus, mind az cpMALR_L1 vonal esetében a kísérlet teljes időtartama alatt 0,2 mM körül maradt. Az első napon szedett dehidratált minták szabad prolin szintje 0,4-0,5 mM között mozgott. A kísérlet második napjára 2 mM nagyságúra emelkedett (23./ A. ábra), és a kísérlet teljes időtartama alatt ezen az értéken maradt.

Só stressz során a kezeletlen leveleken 0,12 mM prolin koncentrációt határoztunk meg (23./ B. ábra). A fitoagaron tartott levélminták a kiindulási naptól kezdve, egészen a negyedik napig bezárólag itt is egyforma koncentrációjú prolin szintet mutattak, mind a vad típusú Golden Promise, mind pedig a transzgénikus vonalunk esetében. Só stressz hatására mért maximális prolin koncentrációt mindkét vizsgált vonalunk csak a negyedik napon érte el (1,6 mM). A transzgénikus vonalunknál a termeltetett MsALR fehérje protektív hatása szignifikáns különbségben azonban nem nyilvánult meg.

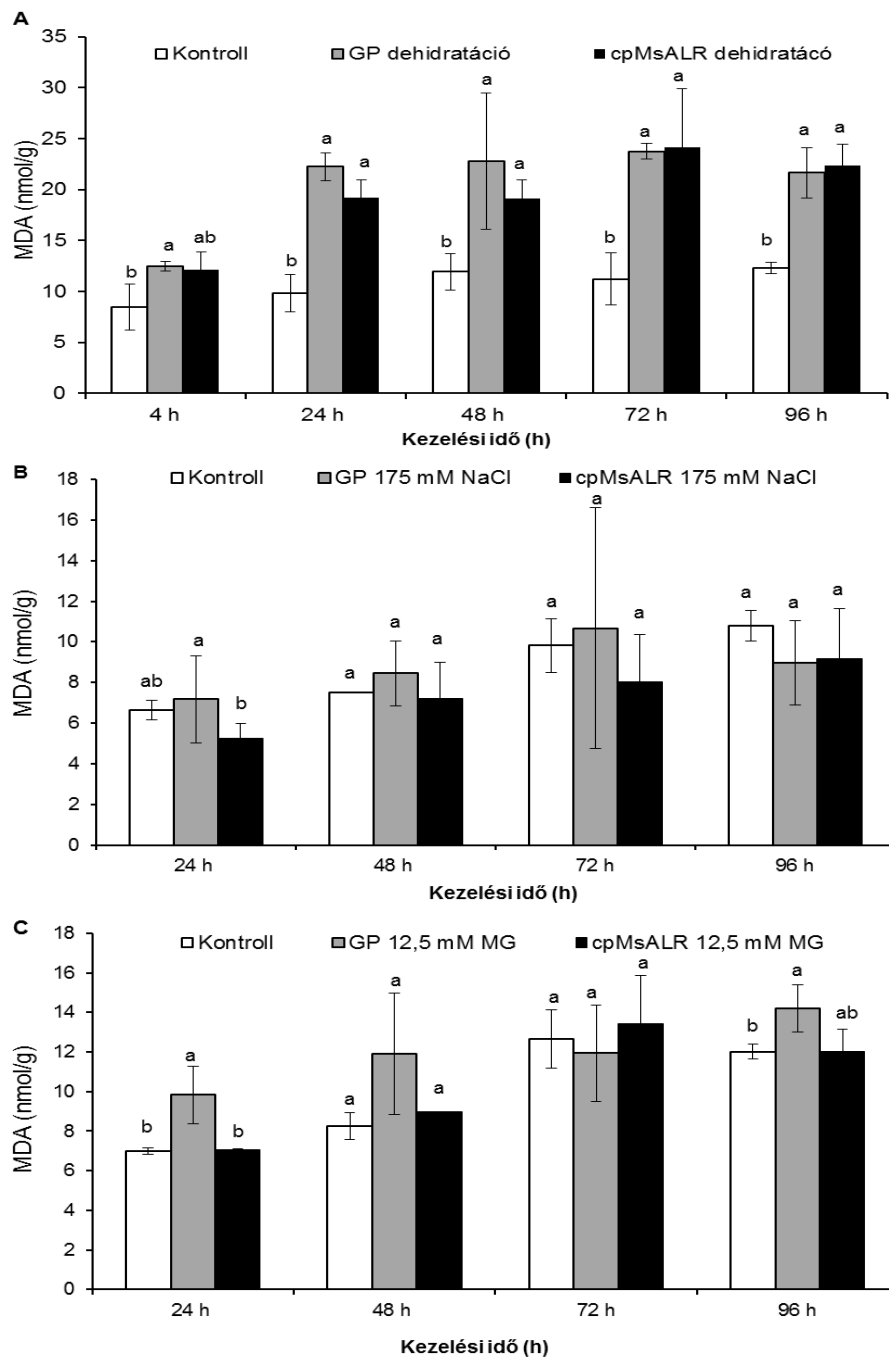
A MG hatásának elemzésekor a prolin ozmoprotektív hatása szintén nem játszott szerepet a károsító hatás kivédésében. A szabad prolin szint a kiszáritás, vagy só stressz során kapott eredményeknél magasabb volt. A fitoagaron tartott leveleken mind a kettő vizsgált vonalunk esetében – és az eddig bemutatott mérésekhez hasonlóan – 0,1-0,3 mM szabad prolin szint volt detektálható. A MG stressz kezelésen átesett leveleken mért prolin koncentrációk naponként egyenletesen növekvő tendenciát mutatva változtak, de a kísérlet zárónapján is alig haladták meg a fitoagaron tartott leveleken mért értékeket, szignifikáns különbség itt sem mutatkozott egyik tesztelt vonal javára sem (23./ C. ábra).



23. ábra: Prolin koncentráció (mM) változása a stresszkezelések időtartama alatt. – a vad típusú Golden Promise fajta és az MsALR fehérjét a kloroplasztisban (cpMsALR) felhalmozó transzgénikus növényekből származó levélszegmensek kiszáritás (A), sóstressz (B) és karbonil (C) stresszkezeléseken átesett levelei. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

A reaktív származékok felhalmozódásának mértékét nézve dehidratáció során a kezeletlen leveleken itt is egyforma, 9-10 nmol/gr reaktív aldehid szintet mértünk. A *kiszáritás* végezetére mért TBA reaktív aldehid koncentrációja a fitoagaron tartott levelek esetében mindkét vonalnál kismértékben növekvő tendenciát mutatott viszont nem volt szignifikáns különbség detektálható a kiszáritott vonalaink között.

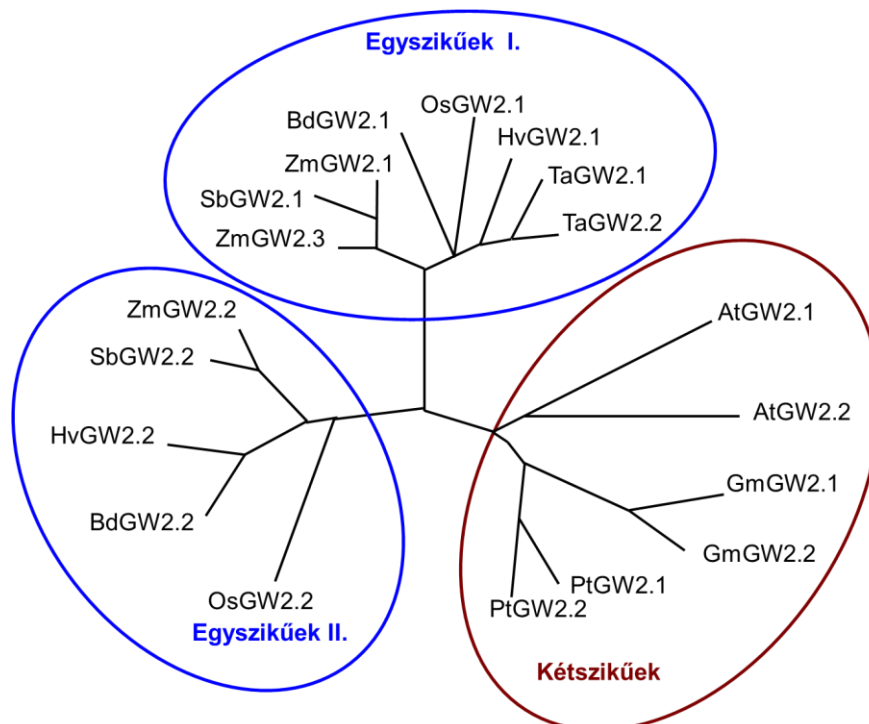
Sóstressz esetén a lipid-peroxidációs termékek mennyiségének meghatározása során mind a kettő vonal setében a fitoagaron tartott levelekhez mérhető aldehid koncentrációt mértünk, egyedül az első nap végeztével volt különbség a transzgénikus vonalunk javára, hasonlóan a MG-lal végzett kísérletek srán mértékhez (24. ábra)



24. ábra: Reaktív karbonil származékok felhalmozódásának üteme a vad típusú Golden Promise fajta és az MsALR fehérjét a kloroplasztiszban (cpMsALR) felhalmozó transzgénikus növényekből származó levélszegmensek kiszáritás (A), sóstressz (B) és karbonil (C) stressz kezelése alatt. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0.05$ valószínűségi szinten szignifikánsan különböznek egymástól.

4.6. Árpa stabil genetikai transzformációja a GW2 gén csendesítésére

Első lépésben adatbázisból azonosítottuk az árpa GW2 homológokat. Megállapítottuk, hogy az árpa genomja, ugyanúgy, mint a rizsé, két ilyen gént kódol (EU333863 és AK250398 azonosítási számmal), azonban a nukleotid sorrendek hasonlósága miatt egyértelműen azonosítható volt a szemfeltöltődésben szerepet játszó gén (az EU333863). Mind egyszikűek, mind a kétszikűek esetében két homológot találunk, azonban az ismert kétszikű szekvenciák egy jól definiálható csoportot alkotnak, míg az egyszikűek esetében a kétfajta homológ egymástól élesen elkülöníthető (25. ábra). A két csoport közötti fehérjeszintű azonosság 40% körüli, azonban ez főként a fehérjék első felére koncentrálódik, ahol az ubiquitin ligáz aktivitásért felelős RING-domén található, a szubsztrát kötésért feltehetően felelős második szakasz szekvenciája teljesen eltérő (*Mellékletek* fejezet, M6.). Ebből arra következtethetünk, hogy a fehérjék élettani funkciója is jelentősen különbözhet, noha mindkét esetben a fehérje degradációs útvonal irányító enzimeiről van szó. A homológ szekvenciák összehasonlítása alapján tehát a fehérje C-terminális felét kódoló szakasz tette lehetővé a specifikus antiszensz technika alkalmazását. Árpa cDNS könyvtár hiányában azonban a megfelelő szakasz amplifikálásához a genomikus struktúrára kellett terveznünk. Ehhez a rizs gén exon-intron szerkezetét vettük figyelembe, s olyan primereket terveztünk, melyek egyrészt a genomikus szekvenciáról képesek amplifikálni egy olyan régiót, mely megfelel az átíródott gén egy szakaszának; másrészt pedig specifikusan képes antiszensz hatást kifejteni az árpa GW2 homológon.



25. ábra: Az egyszikű és kétszikű GW2 homológ fehérjék törzsfája. Árpa homológok a törzsfán: *HvGW2.1* és *HvGW2.2* jelölésekkel.

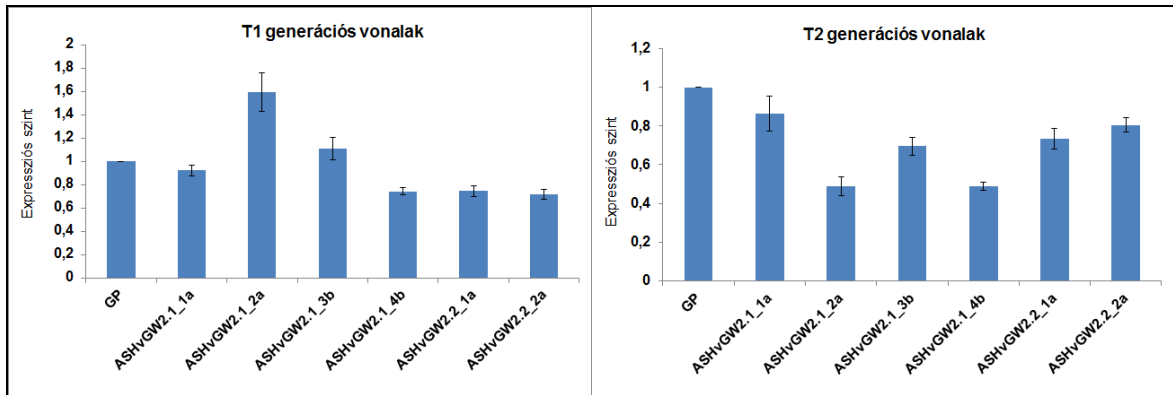
A genomi DNS-ről a Yrg1_120-145_Forw1 és 606-631_Rev1, valamint a Yrg2_3-24_Forw1 és 520-541_Rev1 primerekkel a kívánt 512 bp (Yrg1) és 539 bp (Yrg2) hosszúságú szakaszokat amplifikáltuk, majd a terméket egy következő PCR reakcióban az ASHvGW2.1_BamHI_Forw/_SpeI_Rev, valamint ASHvGW2.2_BamHI_Forw/_SpeI_Rev primerek felhasználásával a klónozáshoz szükséges hasítóhelyekkel láttuk el (*Mellékletek* fejezet, M2.). Emésztés után a fragmentet a pUbi-AB (4745 bp) köztes vektor első, egyszeres hasítással bíró restriktions *SpeI* és *BamHI* helyeire ligáltuk. A köztes konstrukció *SfiI* emésztését követően az expressziós kazettát a p6d35S növényi expressziós vektorba illesztettük. A kész konstrukciót restriktions emésztéssel és szekvenálattal is ellenőriztük, majd a megfelelőnek bizonyult konstrukciót LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe transzformáltuk (*Mellékletek* fejezet, M4.). A kész konstrukcióval a korábban bemutatott transzformációs technológia segítségével éretlen árpa embriókat (szkutellumokat) transzformáltunk, majd a kalluszosodott embriók regeneráló táptalajra helyezésével növényeket regeneráltunk. Az előzőekben említésre került *Agrobacterium* túlnövés ezeken az embriókon is megmutatkozott, melynek köszönhetően itt is csak alacsony transzformációs hatékonyságot sikerült elérnünk. Az ASHvGW2.1 konstrukció (közeli árpa homológ) esetén összesen 13 növényt regeneráltunk, melyek a későbbi PCR analízisek során 4 független transzformáns vonalat bizonyítottak (124 db kalluszosodott embrióra vonatkoztatva 3,22 % transzformációs hatékonyság), az ASHvGW2.2 konstrukció (távoli árpa homológ) esetében pedig mindösszesen csak 8 növényt regeneráltunk, melyek 2 független vonalat bizonyítottak (99 kalluszosodott embrióra vonatkoztatva 2,02 % transzformációs hatékonyságnak felelt meg).

4.6.1. Az ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 transzformáns árpavonalak génexpressziós vizsgálata

Az antiszensz technológiával előállított növények T1 generációjú egyedein (2-2 független vonal egyedein) kvantitatív RT-PCR segítségével végzett génexpressziós analízissel bizonyosodtunk meg a vizsgálandó gének inaktivációjáról, expressziójának gátlásáról. Referencia génnek a búza 18S génre tervezett primereket használtuk, az adatokat $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel értékeltük ki.

A T1 generációjú növényeken végzett elsődleges génexpressziós vizsgálatok alapján a génexpresszió gátlása egyöntetűen, minden vizsgált vonal tekintetében az ASHvGw2.2 vonalhoz tartozó egyedeken volt megfigyelhető, itt mindenhol 0,5-0,9-szeres kifejeződési szintet figyelhettünk meg. Az ASHvGW2.1 génnel transzformált vonalak expressziós szintje 2 vonal (1/1a és 1/4b vonalak) esetében a várt antiszensz hatásnak megfelelően repressziót mutatott, míg

a maradék két vonal esetén a vizsgált növények expressziós szintje vagy a vad típusú Golden Promise-on tapasztalt kifejeződési szinthez volt mérhető, vagy kismértékű (max. 2-szeres) indukció volt megfigyelhető. A T2 generációjú növényeken végzett kísérletek során azonban már mind a kettő génnel végzett transzformások összesen 6 vonalánál repressziót sikerült kimutatnunk (26. ábra).

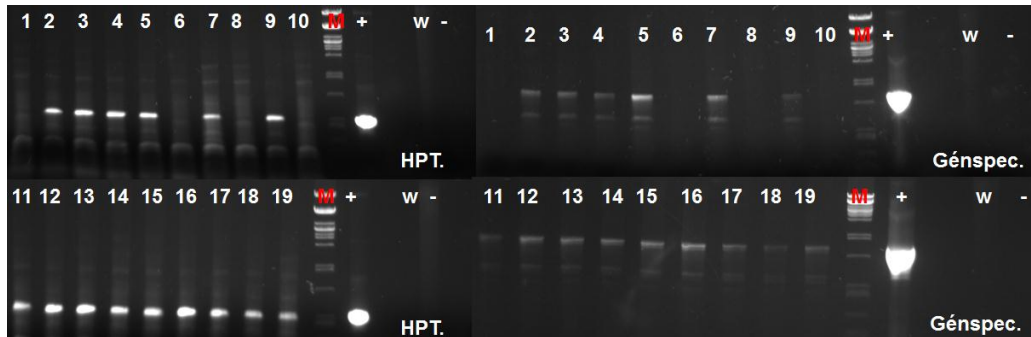


26. ábra: Real Time PCR vizsgálatok T1 és T2 generációjú ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 transzformáns vonalak növényegyedein génexpressziós analízis céljából.

Az antiszensz hatás fenotípusban megmutatkozó változásainak meghatározása végett a Gabonakutató Non-Profit Kht.-val együttműködve megkezdtek a transzgenikus jelölt növényvonalak részletes vizsgálatát. Az elvetett vad típusú Golden Promise, valamint a 6 transzformáns jelölt ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 vonalak T2 generációján végzett, nagyobb egyedszámmal történő analízise (vonalanként 17-20 db) lehetővé tette a fenotípusban megmutatkozó változásokra irányuló következtetések levonását. Összesen 102 növény PCR és fenotípusos analízisére került sor az említett kísérlet során.

A kísérletbe bevont összes növényvonallal PCR vizsgálatokat végeztünk, mind a *hpt* szelekciós markergén (PHYG_Fw és Rev primerek, *Mellékletek M2.*), mind pedig az antiszensz orientációban bejuttatott transzgén jelenlétének bizonyítására (pUbi-AB_Fwd és Rev primerek, *Mellékletek M2.*). A növények tesztelése során arra a következtetésre jutottunk, hogy a kísérletbe bevont növények között elhanyagolható számban, összesen 8 növényről állapítottuk meg, hogy egyik transzgénre vizsgálva sem bizonyult transzformánsnak, további 3 esetben pedig azt tapasztaltunk, hogy a vizsgált növények a szelekciós markergénre (*hpt*) pozitívnak, míg az antiszensz orientációban bejuttatott inszertre negatívnak bizonyultak, azaz erre a transzgénre nézve hasadtak (27. ábra). A növényvonalak fenotípusos analízise során a rögzített adatok kiértékelésénél a PCR reakciók ezen eredményeit is figyelembe vettük, őket az adatok értékeléséből kizártuk.

	Vonal	Növények száma	<i>hpt</i> +	GW2 transzgén +
ASHvGW2.1	1a	19	15	15
	2a	17	16	15
	3b	18	18	18
	4b	19	16	16
ASHvGW2.2	1a	9	9	7
	2a	20	20	20
Σ	6	102	94	91



27. ábra: A Gabonakutató NonProfit Kht-vel közösen végzett kísérletbe bevont T2 generációjú növények PCR analízisének összefoglaló eredménye, s annak szemléltetése az ASHvGW2.1/1a vonal növényeinek példáján bemutatva. Táblázat: Transzformáns jelölt növényvonalak áttekintő tesztelési eredményei (vonalankénti transzformánsok száma) PCR futtatások eredményei: 1-19: ASHvGW2.1 transzformáns jelölt vonal növényedei. M: molekula marker, λ /PstI. +: pozitív plazmid kontroll, w: víz (water) üres kontroll, -: negatív plazmid kontroll. HPT: higromicin foszfortranszferáz szelekciós markergén, Génspec.: GW2.1 homológra tervezett specifikus primerpár.

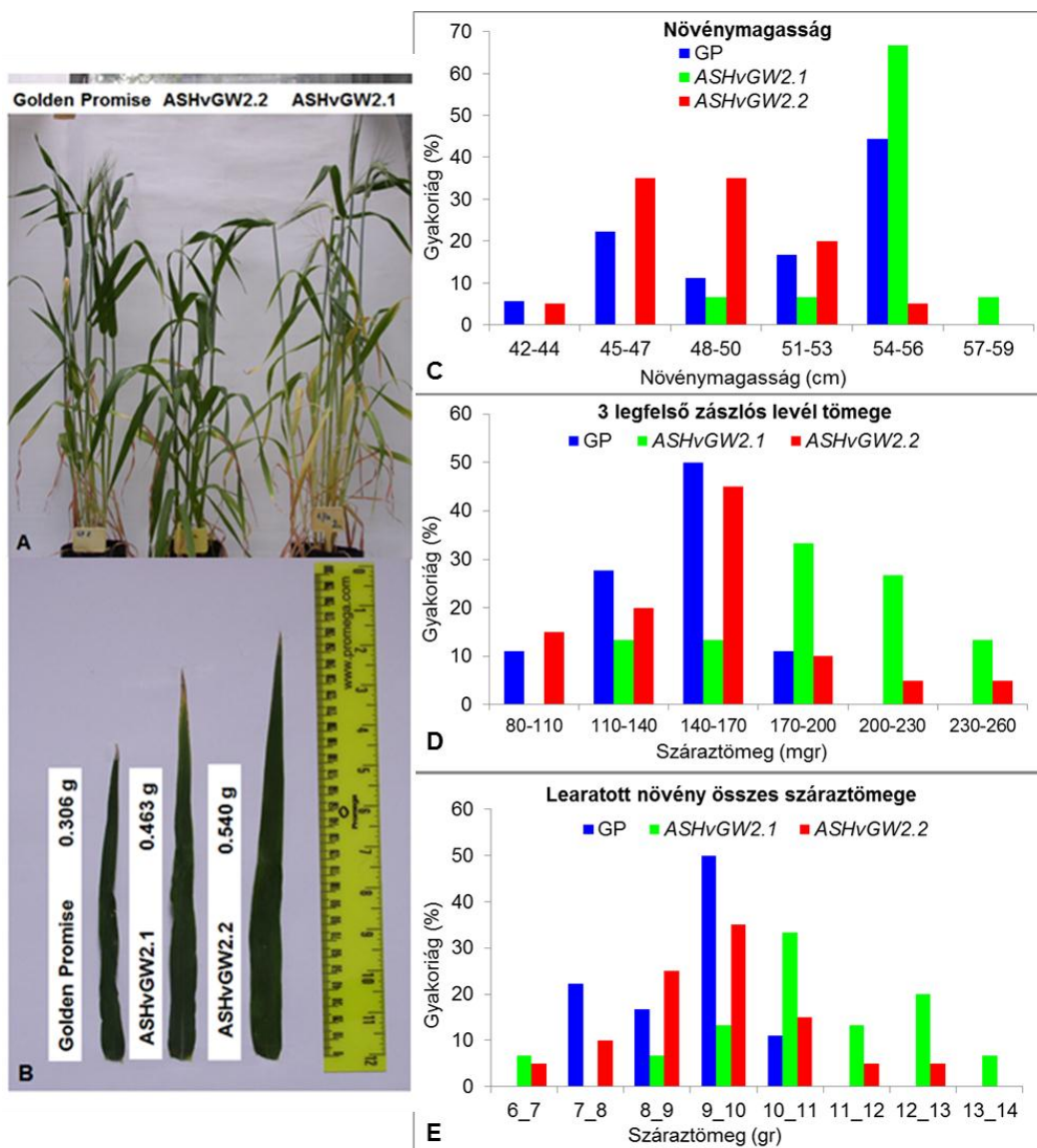
A vegetációs időszak közepén mért növénymagassági paraméterek mellett meghatározásra kerültek a kalászolási és érési időpontok, a kalászatok analízise során pedig kiértékeljük a fő és mellékajtások számát, hajtásonkénti ezerszemtömegét, az aratáskori teljes száraz növénytömeg meghatározását, valamint a vegetációs időszak alatt elsődlegesen tapasztalt, jelentős (levélszélesség) változás miatt a zászlóslevelek aratáskori tömegét. Számítógépes programmal végzett magszemméret analízis segítségével az ígéretesnek tekintett transzgenikus vonalainkon pedig a learatott szemek egyenkénti eloszlási tömegét, szélességét és hosszúságát is meghatározhattuk pixelanalízis segítségével.

4.6.2. A transzgenikus növények fenotípusos jellemzése

A 6 transzformáns vonalból további analíziseinkhez kiválasztottunk 1-1 vonalat, hogy azokat a lehető legrészletesebb módon jellemezhessük. A későbbiekben ezek kerülnek bemutatásra.

A rizs *GW2* közeli árpa homológjának repressziója (*ASHvGW2.1*) a növény vegetatív növekedési fázisában erőteljes fenotípus változást bár nem okozott, a vegetációs idő végén mért növénymagassági adatok tekintetében jóval magasabbnak bizonyultak a kontroll növényekhez képest (28./A, C ábra). A növény azonos pozíciójú levelei (3 legfelső zászlós levélen mérve) a kontroll leveleknél nagyobbak, a tömegükben akár 50 %-os növekedés is tapasztalható volt (28./B,D ábra). Aratáskor nézve a növénymagasságból adódóan jóval nagyobb száraztömeggel voltak jellemezhetőek a kontroll Golden Promise növényekhez képest (28./E ábra).

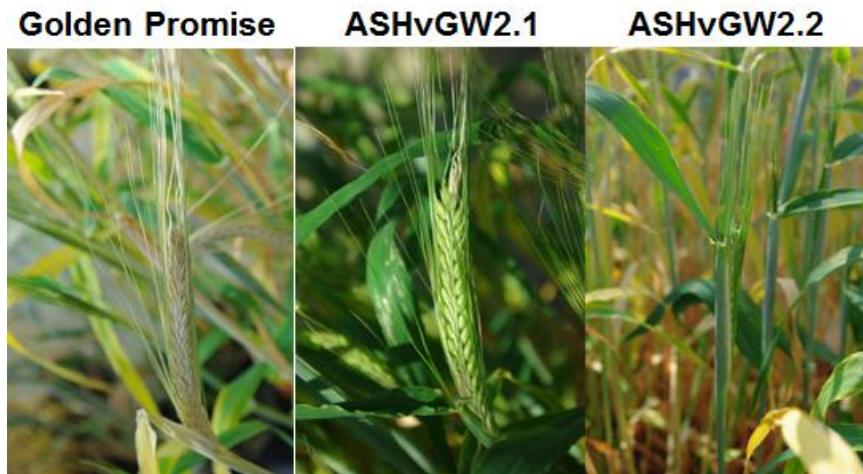
A rizs *GW2* távoli árpa homológ kifejeződésének csökkentése (*ASHvGW2.2*) ezzel szemben jelentős változást eredményezett a vegetatív növekedés fázisában. (28./A ábra). A növények alacsonyabbak (26./A, C ábra), az alacsonyabb növénymagasság ellenére azonban a nagyobb bokrosodásnak köszönhetően nagyobb aratáskori száraztömeggel, levélméret növekedéssel jellemezhetőek (28./ B, E ábra).



28. ábra: Az *ASHvGW2.1* és *ASHvGW2.2* transzformáns vonalak fenotípusos jellemzése a vegetációs időszak végén mért növénymagasság (A, C), aratáskori száraztömeg (B, D, E) adatok eredményein bemutatva.

A kalászosítás az *ASHvGW2.1* transzformánsok esetében a kontrollhoz képest előbb kezdődött (körülbelül egy héttel), azonban a kalász érésének folyamata lassúbb, a tejes és viaszos érés időtartama hosszabb volt (29. ábra). A jobb szemfeltöltődés és a kialakuló nagyobb szemméret és – tömeg közötti összefüggéseket elsősorban ezzel magyarázzuk. Az azonos időben fényképezett kalászosok példája a 27. ábra láthatóak.

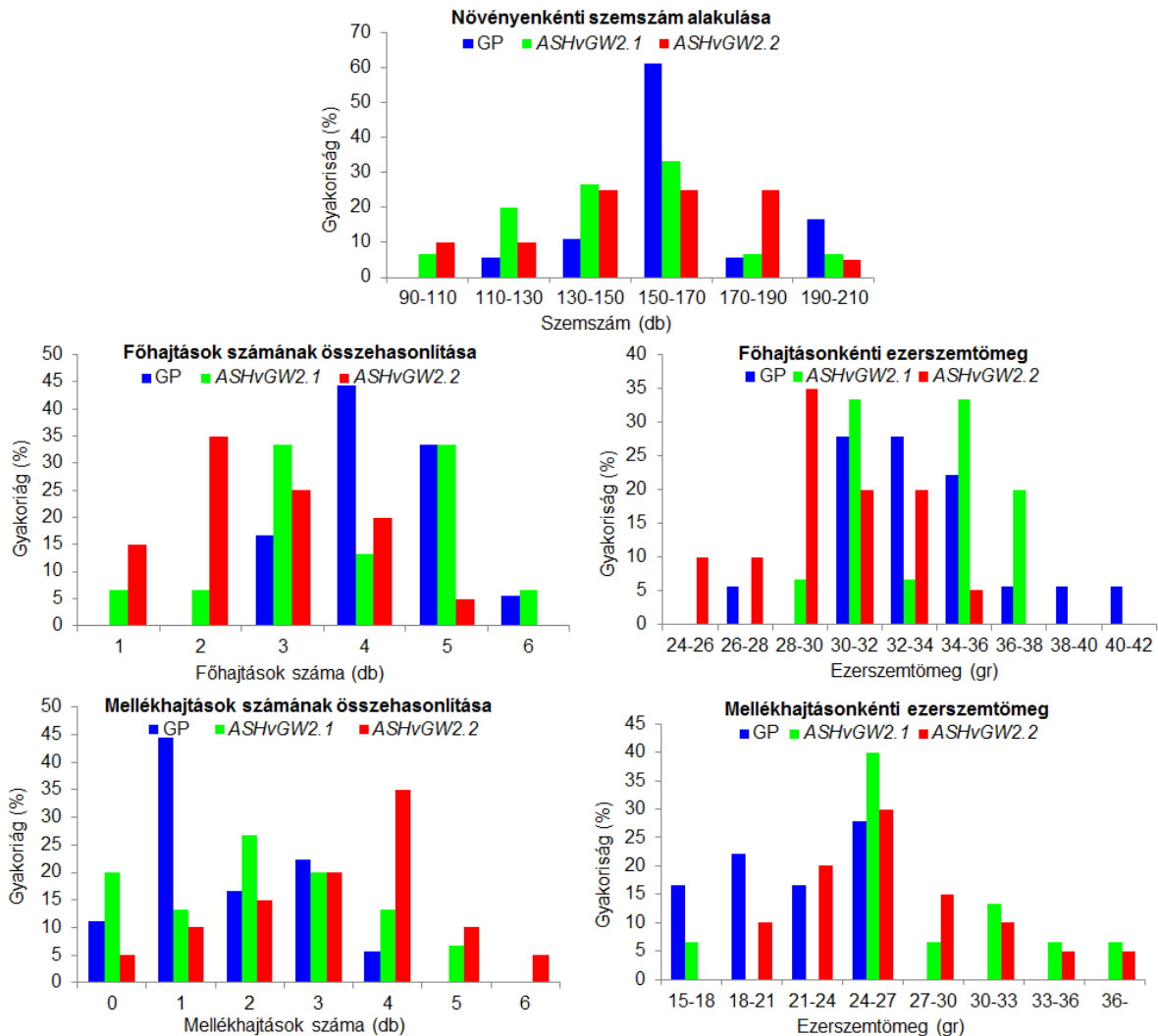
Az *ASHvGW2.2* transzformánsok esetében a kalászosítás legalább egy hét késéssel indul meg a kontrollhoz képest, a kalászosok gyakorlatilag a teljes érés során is levélfedettek voltak (29. ábra).



29. ábra: Kalászosok érettségi állapotának jellemzése a különböző vonalakban, azonos korú növények esetében.

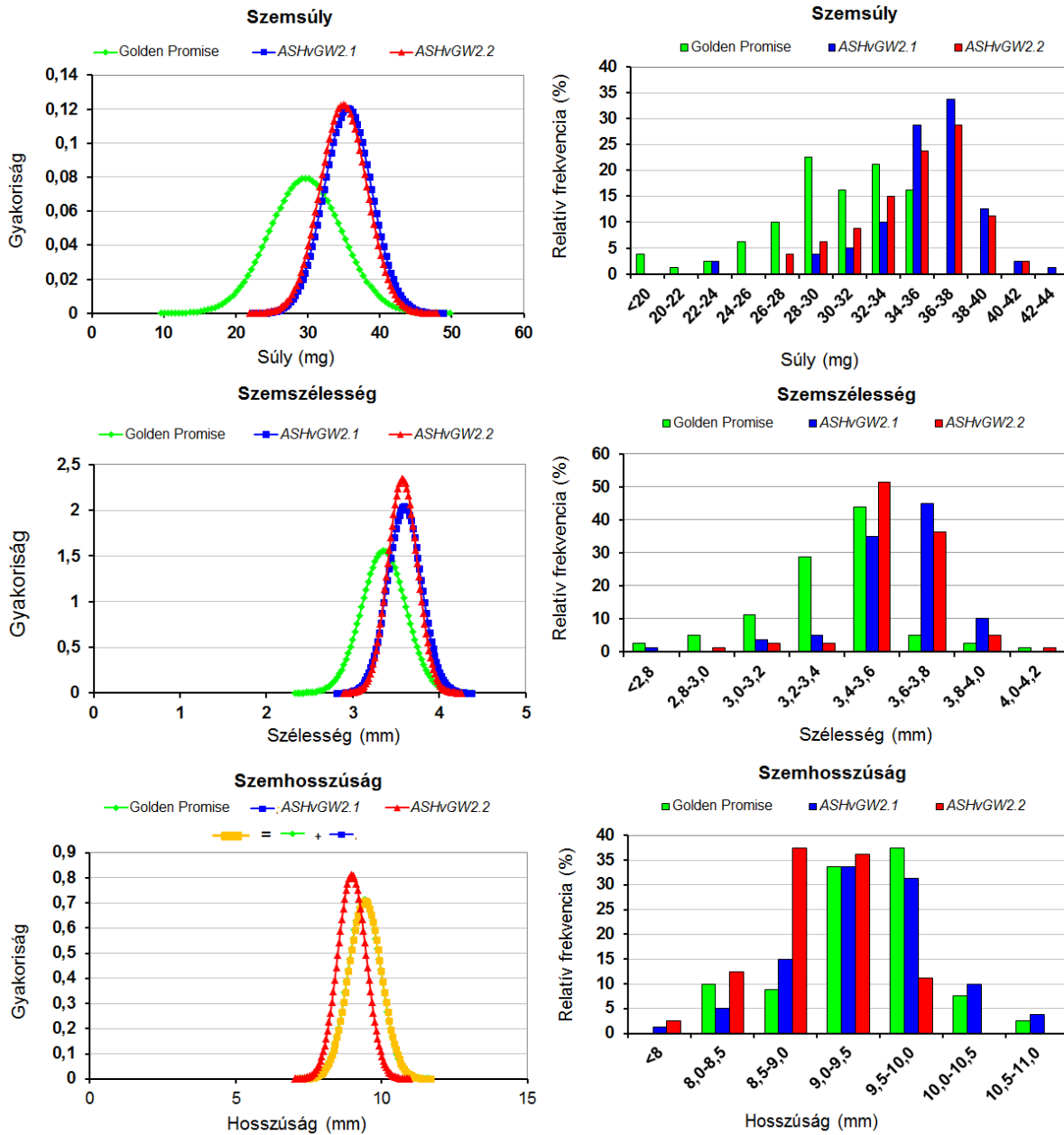
Szemszámolási adatainkat elemezve megállapíthattuk, hogy mindkét transzformáns vonalunk összességében kevesebb magszámmal volt jellemezhető. Bokrosodás tekintetében mindhárom tesztelt vonal egymáshoz hasonló számú hajtást növesztett, tényleges eltérések azonban a kontroll növényekhez viszonyítva a fő- és mellékajtások számában mutatkoztak.

Mindkét transzformáns vonal esetében kevesebb főhajtást számolhattunk meg, míg mellékajtások számában az *ASHvGW2.2* transzformánsok jóval felülmúlták az *ASHvGW2.1* transzformánsokat, és kontroll növényeket. Mindezekből adódóan hasonló eredmények mutatkoztak a fő- és mellékajtásokon mért ezerszemtömegben is: a mellékajtásokon mért ezerszemtömegek mindkét transzformáns vonal esetében felülmúlták a kontroll növényeken mértéket, még a kevesebb szemszám ellenére is.



30. ábra: Az ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 transzformáns vonalak növényenkénti szemszám alakulása a fő- és mellékajtások számának, valamint a fő- és mellékajtásonként mért ezerszemtömeg tükrében a kontroll (GP) növényekhez viszonyítva.

Annak eldöntése végett, hogy a mellékajtásokon mért magasabb szemsúly a szemek mely növekedési (szélesség, hosszúság, tömeg) paraméterével magyarázhatóak, a vonalankénti magokat számítógépes pixelanalízisnek vetettük alá (*Mellékletek* fejezet, M5./4. fénykép). Ennek köszönhetően a mért paraméterek tekintetében eloszlási görbéket határozhattunk meg. Összességében elmondhattuk, hogy a nagyobb ezerszemtömegek elősorban a szemek szélesebb voltának, valamint ebből adódó nagyobb tömegükkel voltak magyarázhatóak a transzformánsok esetében, ehhez a szemhosszúságban mért csekély változások voltak feljegyezhetőek a kontroll növényeken mért szemekhez képest (29. ábra).



31. ábra. Az ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 transzformáns vonalak szemsúly, szemhosszúság és szemszélesség pixelanalízis segítségével végzett kiértékelése

4.7. Új tudományos eredmények

1. Szakirodalmi adatok alapján az árpa szárazságtűrésében feltételezhetően szerepet játszó saját génjeinek; a *HvARH1* és *SRG6* gének abszcizinsav kezelés hatására adott génexpressziós változásait elemeztük. **Az adott haplotípusokba tartozó árpafajták esetén vizsgáltuk az inszerciós-deléciós mutációk hatását az ABA-indukált génexpressziós változásokban.** A *HvARH1* génnél a kezelés hatására minden esetben a gén erőteljes indukcióját tapasztaltunk. Ez a *HvARH1-Z1* genotípusban volt a legkifejezettebb. Az *SRG6* gén esetében az irodalomban közöltekkel ellentétben viszont csak moderált génexpressziós változást figyeltünk meg.
2. Elkészítettük a *p6d35s-MsALR* és *p6d35s-cpMsALR* konstrukciókat, melyeket felhasználva *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével éretlen tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* L. cv. **Golden Promise**) embriókat transzformáltunk. Árpában stabil genetikai transzformációs célra rutin módszerré fejlesztettük ezt az agrobaktérium által közvetített transzformációs módszert. **Sikeresen állítottunk elő 24 független** (14,3 % transzformációs hatékonyság): **az MsALR fehérjét a citoszólba, és 5 független: az MsALR fehérjét a kloroplasztiszbba targetáló transzformáns árpavonalat** (4,4 % transzformációs hatékonyság). A transzgén expresszióját, s utódnemzedékekbe történő átörökítését, kópiaszámát molekuláris genetikai módszerekkel mindegyik transzgenikus vonal esetében, több generáción keresztül alátámasztottuk.
3. **Az MsALR gén abiotikus stresszválaszokban betöltött szerepét fluoreszcencia detekciós módszerre alapozva tanulmányoztuk, a létrehozott stabil *p6d35S-MsALR* és *p6d35S-cpMsALR* árpavonalak dehidratáció, só és karbonil stressztűrés vizsgálataival.** Itt az abiotikus stresszre (pl. dehidratáció) stresszre érzékeny DsRED marker fehérjét expresszáló sejtek száma jelezte a stressz súlyosságát. A GFP/DsRED módszer felállítását után megállapítottuk, hogy a fluoreszcens sejtarány alkalmas paraméter a levelek abiotikus stresszekkel szembeni ellenálló képességének gyors, rutinszerű vizsgálatára. A fluoreszcens tesztelés módszert bármilyen laborkörülmények közé könnyen adaptálhatóvá alakítottuk, mely egyaránt alkalmas lehet egyéb más Petri-csészékben végrehajtható stressz kezelése hatásának tanulmányozására is. A stresszkísérletek során igazoltuk, hogy az MsALR fehérje citoszólban, vagy kloroplasztiszbban való felhalmozódása egyaránt növeli a tavaszi árpa abiotikus stresszellánállóságát.

- 4. A magméret befolyásolásában szerepet játszó GW2 gén árpa homológjait antiszensz orientációban tartalmazó stabil transzformánsokat hoztunk létre a p635S-ASHvGW2.1 és ASHvGW2.2 konstrukciók segítségével. Az ASHvGW2.1 konstrukció esetén 4 független (3,22 % transzformációs hatékonyság), az ASHvGW2.2 konstrukció esetében pedig 2 független (2,02 % transzformációs hatékonyság) transzformáns vonalat bizonyítottunk. A transzformáns vonalak jellemzése, fenotipizálása során megállapítottuk, hogy mindkét árpa homológ géncsendesítése megnöveli az átlagos növénymagasságot, és mindkét GW2 homológ kifejeződésének csökkentése egyaránt megváltoztatja a szemsúly és szemszélesség eloszlását.**

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

A közelmúltban befejeződött genom szekvenálási programnak (The IBGS Consortium 2012) köszönhetően az árpa az utóbbi években a géntechnológiai kutatások egyre gyakrabban alkalmazott genetikai modell-növényévé vált, köszönhetően annak, hogy egyre több adattal rendelkezünk a növényfaj genetikai információját illetően. A genetikai információban rejlő funkciók felderítése azonban nagy kihívások elé állítja a kutatókat. Részletes génfunkció-vizsgálat végrehajtható transzgenikus növények előállításával; gének elhallgattatásával (antiszensz technológia) vagy túltermeltetésével, illetve az adott gén expressziós vizsgálatainak elemzésével. A dolgozatban leírt stabil transzformációs kísérletek eredményei ezeknek a génfunkciós vizsgálatoknak képezik alapját.

5.1. Az árpa szárazságtűrésében szerepet játszó génjelöltek azonosítása

Egy gén lehetséges funkciójának megismeréséhez elengedhetetlen megismerni a gén kifejeződését módosító tényezőket. Az elmúlt évek szakirodalmi eredményeinek köszönhetően számos olyan tényező vált ismertté, amely a szárazságtűrésben szerepet játszó gének transzkripcióját befolyásolja. Egyes gabonafajták, pl. rizs esetében már publikált eredmények is mutatták, hogy a stressz toleráns és stressz érzékeny fajták eltérő aldo-keto reduktáz génexpresszióval rendelkeznek (Karuna Sree et al. 2000). Munkánk során így arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a szárazságtűrő árpa genotípusok esetében tudunk-e hasonló irányvonalat kimutatni, illetve meg tudjuk-e adni ennek az esetleges különbözőségnek a genomikai hátterét. Munkánk során első lépésként vizsgáltuk az árpa saját génjeinek abszcizinsav (ABA) kezelésre adott expressziós válaszát. A dolgozat témájához kapcsolódóan először az árpa aldóz reduktáz homológ gén (*HvARH1*) által kódolt fehérje volt (Bartels et al. 1991; Roncarati 1995) vizsgálataink célpontja. Ezt az árpa gént szárazságtűrő embrióból készített génbankból differenciál dignózis módszerével azonosították, s a fellelhető kísérleti eredmények szerint kifejeződése fejlődés specifikus és hormonregulált. Promóterében Roncarati et al. (1995) azonosították ugyanis az ABRE elemet, amely abiotikus stressz hatására indukálódó gének ABA közvetítette kifejeződésének szabályozásában játszik szerepet (Shinozaki et al. 1998). Ezen adatokból kiindulva kísérletet tettünk a gén genotípus független transzkripció válaszának igazolására. A Törjék Ottó vezette munkacsoport kutatásaihoz kapcsolódva a *HvARH1* gén esetében az árpa genotípusok 3 fő haplotípusba (*HvARH1-Z1*, *HvARH1-Z4* és a *HvARH1-Z6*) voltak csoportosíthatóak. A genotípusok közötti legfontosabb eltérés a promóter régióban volt megfigyelhető: a translációs starttól upstream irányban elhelyezkedő 6 bp hosszúságú deléción

(Z4 és Z6), illetve 9 bp hosszúságú inszerció volt (Z1). A levágott, fiatal leveleken alkalmazott egy napos, 50 μ M ABA kezelés hatására a relatív transzkriptszintben egyöntetűen jelentős emelkedést tapasztaltunk minden vizsgált genotípus esetében. A legkifejezettebb változást a HvARH1-Z1 genotípusban figyeltük meg, ebben a csoportban a génexpresszió 20-60-szoros növekedést mutatott a vizes kontroll kezelt levelekben mért értékekhez képest. A Z4 és Z6 haplotípusba tartozó tájfajták alacsonyabb, mindössze 10-szeres gén expresszió-emelkedést mutattak a kezelés hatására. A *Compana* genotípusban a többi mintához képest detektált kimagasló expressziós szint azonban előrevetítette a nagyobb mintaszámmal végzendő további génexpressziós vizsgálatok szükségszerűségének felvetését, nagyobb mintaszámból még pontosabb következtetéseket vonhatunk le az adott haplotípus csoportokba tartozó genotípusok hormon indukált expressziós válaszaiból.

Vizsgáltunk egy másik, szintén szárazságstressz elleni védelemben szerepet játszó génjelölt; a *HvSRG6* gén hormonindukált expresszióját. A gén szárazságtűrésben betöltött szerepének és ABA kezelés hatására adott expressziós változás-vizsgálatának alapját *Malatras* és mtsai. által (2002) leírt eredmények adták. Az árpa *SRG6* gént, double haploid (DH) térképezési populációk vizsgálatánál a 7H kromoszóma olyan konzervált régiójába tették, amely régió szoros összefüggésbe hozható az árpa és egyéb gabonafélék ozmotikus stressz adaptációban betöltött szerepével. A gén ABA indukált expressziós változásainak vizsgálatát 5 olyan genotípusban vizsgáltuk, amelyek a teljes hosszúságú promóter szekvenciát tartalmazták, illetve 3 olyan genotípusban (Otis, Chilga és Diamond), melynek promóter régiója a transzlációs starttól 158 bp távolságra egy 197 bp nagyságú inszerció-deléció mutációt tartalmazott. Mivel a hormon hatására is csak mérsékelt génexpressziós különbségeket detektáltunk, elvégeztük a promóter régió internetes adatbázisban végzett elemzését is. Ennek eredménye bizonyította, hogy a hormonindukációhoz szükséges elemek egyike sem található az inszerció-deléció régióban. Általánosságban, az irodalomban fellelhető adatok alapján azonban elmondható, hogy az *SRG6* gén expressziója azon genotípusokban kifejezetten magas, ahol sok fiziológiai karakter (gázcsere, PS(II) fotokémiai rendszer teljesítménye, sejtmembrán stabilitás) is kevésbé érzékeny a szárazság stressz (Rapacz et al. 2010) okozta változásokra, megerősítve ezáltal azt a feltevést, hogy a génjelöltünk fontos részét képezi a szárazság stressz elleni védelem komplex mechanizmusának (Xu et al. 2010; Tong et al. 2007). A gén hormon indukált expressziójával párhuzamosan végzett egyéb fiziológiai paraméterek elemzése tehát még átfogóbb képet adhat a gén genotípus függő expressziójáról.

5.2. Árpa transzformáció *Agrobacterium tumefaciens* közvetítésével

Az egyes gének funkciójának felderítésében a gének genetikai transzformációjával (elcsendesítésével vagy túltermelésével) szerezhethetjük a legátfogóbb képet. Dolgozatomban következő részeiben az abiotikus stressz rezisztenciával és szemméret növeléssel kapcsolatban végzett kísérleteink eredményeiről szólnak. A transzformációhoz elsőként választott gén a *Medicago sativa* eredetű aldóz-reduktáz (*MsALR*) volt, melynek az abiotikus stressztűrőképesség fokozásában van jelentősége (Oberschall et al. 2000). Ezen transzformációk során az *MsALR* fehérjét a citoszólba (p6d35S-*MsALR*) és/vagy a kloroplasztiszba (p6d35s-cp*MsALR*) targetáló árpavonalakat is előállítottunk. A konstrukciók előállításával párhuzamosan az árpa *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációs protokolljának (Hensel et al. 2004) laboratóriumi körülményeink közé történő adaptálása is sikeresen megtörtént. Létrehoztunk 24 független (14,3 % transzformációs hatékonyság); az *MsALR* fehérjét a citoszólba, és 5 független; az *MsALR* fehérjét a kloroplasztiszba targetáló transzformációs árpavonalat (4,4 % transzformációs hatékonyság). Ezen transzformációs eredményeinkkel nemcsak a sikeres transzformációt támasztottuk alá, hanem az irodalomban fellelhető adatokhoz hasonló (Hensel et al. 2008), de akár magasabb transzformációs hatékonyságot is bemutattunk. A PCR analízissel ellenőrzött vonalak mindegyikében ki tudtuk mutatni nemcsak az *MsALR*, hanem a szelekciós markergén (*Hpt*) jelenlétét, és fehérje immunoblot analízis során pedig a szintetizálódó *MsALR* fehérjét. A termelt fehérjét a kloroplasztiszba targetáló *p6d35s-cpMsALR* vonalak esetében a citoszólos transzformációs vonalakkal összehasonlítható mértékben szintetizálódó fehérjét detektáltunk, mely bizonyította, hogy az árpa Rubisco kis alegység tranzit peptid hatékony célbajuttató szekvenciát biztosított a fúziós protein számára.

A bizonyítottan fehérjét termelő vonalak közül későbbi vizsgálatainkhoz egy –egy magas fehérje expressziós szinttel jellemezhető vonalat választottunk ki, melyet több generáció keresztül fenntartottunk a későbbi tesztelési eljárásainkhoz szükséges alapanyagot biztosítva. A citoszólos transzformációs vonalunk esetében (L3 vonal) a beépült transzgen kópiaszámát, a jelenleg legmegbízhatóbb módszerrel (Gadaleta et al. 2011), kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg. Az *Agrobacterium* által közvetített genetikai transzformáció a vizsgált *MsALR* transzformációs vonalunkon a várakozásokkal ellentétben magas kópiaszámot eredményezett: mindkét számolási módszerrel 10 feletti beépülési kópiaszámot mutatott ($14,9 \pm 2$ valamint $11,2 \pm 0,84$). Ez az irodalomban fellelhető adatokhoz képest ellentétben állt, hiszen az agrobaktériumos transzformálás általában alacsony beépülési kópiaszámot eredményez (Bartlett et al. 2008). Az ellentétes orientációban beépülő transzgen kópiák genom instabilitáshoz, rekombinációs eseményekhez illetve géncsökkentéshez vezethetnek (Wolffe et al. 1997;

Travella et al. 2005), bár ennek ellenkezőjére is vannak példák. Hernandez-Garcia és mtsai. (2010) új szója promóterek vizsgálatakor leírták azt, hogy egyenes arányosságot tapasztaltak a GFP transzgén kópiaszáma és a termelt GFP fehérje mennyisége között. Nem különleges tehát az sem, hogy egy több MsALR kópiát tartalmazó transzformáns vonalunk esetében magas fehérjeszintet tudunk kimutatni.

Változó frekvenciával mindig előfordulhatnak tehát olyan vonalak, melyek ötnél több kópiát is tartalmaznak. Hensel és mtsai. (2008) sem tudtak közvetlen kapcsolatot találni a több kópiát tartalmazó transzformánsok előfordulása és a transzformáció során alkalmazott kezelések illetve *Agrobacterium* törzsek között. Fontos megjegyeznünk azt, hogy esetünkben ez a magas kópiaszám nem géncsendesítéshez vezetett (Wolffe et al. 1997), hanem a fehérje immunoblot analízise szerint magas expressziós szintet biztosított, melyhez a csoportban végzett korábbi kutatások (Oberschall et al. 2000) során termeltetett α -MsALR poliklonális ellenanyagot és peroxidáz konjugált anti-nyúl IgG antiszérumot használtunk. Ez az ellenanyag képes volt a transzgenikus árpákban szintetizálódó MsALR fehérje kimutatására, amellett, hogy elhanyagolható háttért eredményezett a nem transzformáns Golden Promise vonalak fehérje mintáin. Az ellenanyag rutinszerű tesztelési eljárást biztosított az MsALR transzformáns jelölt vonalaink esetében.

A magas transzformációs hatékonyság az agrobaktériumos transzformáció egy másik előnyét is igazolta, miszerint a közvetett géntranszfer e fajtájánál a transzgén gyakrabban fejeződik ki. A biolisztikus és agrobaktériumos transzformációs módszer során eredményezett génexpressziós arányok összehasonlítására Travella és mtsai. (2005) végeztek kísérleteket árpában. Eredményeik szerint a génbelövással előállított transzgenikus vonalak 25 % -a, míg az agrobaktériummal előállított vonalak 71 % -a eredményezett transzgén kifejeződést.

5.3. Tranziens génexpressziós tesztrendszer az *MsALR* gén abiotikus stresszválaszban betöltött szerepének bizonyítására

Az MsALR transzformáns árpavonalaink tesztelésére kialakított tranziens génbelövésen alapuló tesztrendszer alapját Marzin et al. (2008) által leírt protokoll adta. Az általuk leírt dehidratációs stresszben használt TIGS rendszer, az árpában már egy második fenomikai eszköz, a liztharmat elleni védekezésben érdekelt gének tesztelésére létrehozott tranziens vizsgálati rendszer után (Douchkov et al. 2005). Mindkét rendszer egyaránt alkalmas több száz, vagy akár néhány ezer gén dehidratáció stressz elleni védelemben, vagy patogén rezisztenciában betöltött lehetséges szerepének tisztázására. Mindkét rendszer közös előnye, hogy a gének analízise közvetlenül elvégezhető a vizsgált növényfajon, anélkül, hogy külön modell-rendszert állítanánk

fel a gének tesztelésére (pl. *Nicotiana benthamiana*, élesztő kettős hibrid, *Arabidopsis thaliana*, stb), ahol már működnek nagy áteresztőképességű tesztrendszerek (Warringer et al. 2003, Devi et al. 2006)

Az árpa leveleken végzett stressztűrési kísérleteinkhez – ezen irodalmi adatok alapján – megfelelő markernek bizonyult a zöld fluoreszcens GFP (*Aequorea victoria*) (Shaner et al. 2005, Heim et al. 1995, Tsien 1998) és a vörösen fluoreszkáló DsRed fehérje (*Discosoma sp.* Red fluorescent protein). A DsRed fehérje biokémiai tulajdonságai alapján alkalmas volt arra, hogy jobban megismerjük és jellemezzük az alkalmazott stresszt a fluoreszcens fehérjét termelő árpa epidermisz sejtekben. A DsRed fehérje aktív tetramer komplexszé történő asszociációja ugyanis hosszú és a stressz által gátolt folyamat, ezért a kísérleti rendszerben alkalmazott 4 napos stressz kezelés végeztével megszámlálható vörösen fluoreszkáló sejtek aránya a GFP-t termelő, zölden fluoreszkáló sejtekhez képest jó indikációja nemcsak az alkalmazott stressz erősségének, de a vizsgált növényvonalunk sejtszintű stressz toleranciájának is. A vízhiányos állapot során kialakult denaturáló körülmények, a felerősödött proteolitikus aktivitás és sejthalál ugyanis módosítja, csökkentti az érett DsRed mennyiségét (Gross et al. 2000, Baird et al. 2000). Megnö a vörösen fluoreszkáló sejtek aránya azonban akkor, ha a transzgenikus növény ellenállóbb a stressz hatással szemben. A fluoreszcens fehérjék termeltetésén alapuló tranziens expressziós tesztrendszer általunk alkalmazott variánsának előnye más módszerekkel szemben, hogy egyszerűen adaptálható más, laborkörülmények között előidézhető stressz esetén is, továbbá egyes – például gyökérnövekedést vizsgáló hidroponikus – kísérletekkel szemben lényegesen gyorsabb tesztelési eljárás. Olyan esetekben is információt nyújthat a vizsgált abiotikus stresszel szembeni tolerancia mértékére, amikor más paraméterek (például fotoszintetikus hatékonyság) még nem mutatnak detektálható különbséget. Az általunk alkalmazott tranziens teszt módszer a fiatal (10 napos) leveleken végzett stressz tolerancia vizsgálatok mellett alkalmas lehet zászlóslevelek, vagy akár nem fotoszintetizáló szövetek (például sejtszuspenzió, vagy folyadék kultúrában növesztett gyökér) sejtszinten mérhető stressz válaszainak vizsgálatára is.

A fluoreszcens tesztelés a dehidratációs, só és karbonil stressz során fellépő sejtszintű stresszválaszok értékelésében megfelelő módszernek bizonyult a p6d35S-MsALR (citoszól) és p6d35S-cpMsALR (kloroplasztisz) transzformáns vonalainkon; a kiválasztott transzgenikus vonalaink mind a GFP és DsRED fehérjét termelő, zölden és vörösen fluoreszkáló epidermisz sejtek arányában a vad típusú kontroll növényekhez képest szignifikánsan magasabb értékeket mutatott, s egyben az alkalmazott abiotikus stresszekkel szemben ellenállóbbnak bizonyult. Az aldóz-reduktáz gén tehát alkalmasnak bizonyult az abiotikus stresszek hatására képződő reaktív aldehidek toxikus koncentrációjának redukciójában (Oberschall et al. 2000). Ezzel összhangban

van korábbi kutatásaink eredménye is, mely a citoplazmatikus aldóz-reduktáz fehérje *in vivo* védőfunkciójáról számolt be transzgenikus búza növényekben (Fehér-Juhász et al. 2014).

Kísérleteink során megvizsgáltuk a levelek fotoszintetikus aktivitásának változását a kiszáritás során. A kísérletben résztvevő növényeknél PSII fotokémiai rendszer maximális kvantumhatékonyságát (F_v/F_m) és effektív kvantumhatékonyságát [$Y(II)$] fluoreszcencia kinetika méréssel is meghatároztuk (adatok nem mutatva): először a levélszegmensek levágásakor, majd a belövést követően, végül a stresszkezelés befejezésekor is végeztünk méréseket. Bár az eredmények néhány kísérlet esetében a GFP/DsRED arány és a klorofill tartalom során mért adatokhoz hasonló eredményt szolgáltatottak (a transzgenikus növényvonalunk magasabb értékeket mutatott a stresszkezelés végeztével), azonban ezek a különbségek egyetlen esetben sem bizonyultak szignifikánsnak a vad típusú Golden Promise leveleken mért adatokhoz képest. Megemlítendő azonban, hogy a transzgenikus árpa az MsALR enzimet a citoplazmában felhalmozva működése közben jelentősen csökkenthette a reaktív aldehidek káros hatását. Ez azonban csak áttételesen jelentheti a fotoszintetikus apparátus védelmét, így kaphattunk szignifikáns különbséget a teszt módszer alkalmazásakor annak ellenére, hogy a fotoszintetikus paraméterekben nem tapasztaltunk számottevő eltérést (adat nem mutatva). Mindezek alapján elmondható, hogy a tranziens tesztrendszer alkalmazásakor a növények különböző abiotikus stressz kezelésekre adott válasza során elsősorban olyan sejtszinten vizsgálható különbségeket mérünk, amikor a stressz tolerancia alakulása nem elsősorban a kloroplasztiszokhoz, mint fotoszintetikus sejtsejtszervecskéhez köthető. Az eredményekből joggal következtethetünk nemcsak a vizsgált növények stresszel szembeni jobb túlélési arányaira, de közvetve ez által a túlélésből eredendő nagyobb termés mennyiségre is. A fent említett okok miatt a sejtszintű stressz tűrés jellemzésére inkább az eredmények részben részletezett paraméterek (klorofill és karotinoid tartalom) bizonyultak alkalmasnak.

Parida és Das (2005) közleményében írt a fotoszintetikus pigmentek stressz érzékenységről, mely szerint a csökkent klorofill tartalom a só stresszre adott válasz általános jelensége, amely miatt a klorofill szintézis degradációja és klorózis megindulása figyelhető meg a növényekben, hasonlóan a szárazság-stressz (Kirnak et al. 2001) során megfigyeltekhez. Ezek a pigmentek szerepet játszanak a szinglet oxigénformák hatása elleni védelemben, megelőzve az oxidatív stressz által kiváltott lipid-peroxidációs folyamatok beindulását. Munkánk alatt a stresszkezelések során mért GFP/DsRED sejtarányokban kapott szignifikáns különbségek alátámasztására klorofill és karotinoid izolálásokat is végeztünk tehát. Megállapítottuk, hogy mindhárom stresszkezelés a várakozásoknak megfelelően mindkét transzformáns vonalunk esetében (L3 és cpL1) csökkentette a klorofill tartalmat. A dehidratáció és sóstressz esetén a stressz kezelt levelek szignifikánsan magasabb klorofill mennyiséggel voltak jellemezhetőek,

mely igazolta az MsALR fehérje védő hatását az alkalmazott stresszekkel szemben a fotoszintetikus apparátus megvédése által. A metilglioxállal (MG) végzett stressz kezelések a stresszelt transzgenikus levelek csak 5 %-kal több klorofill tartalmat mutattak, mely azt engedte feltételezni, hogy a detoxifikáló enzim stresszvédő hatása nemcsak a citoszólban felhalmozott fehérjék lehetséges károsodásnak megelőzésében van. Karotinoid tartalom tekintetében a dehidratációs stressz kezelés után enyhe csökkenés volt megfigyelhető a transzgenikus és nem transzgenikus vonalainkon. A só és MG kezelés nem mutatott hasonló változást: emelkedett vagy éppen nem változott a stresszkezelés hatására. Ez a megfigyelés azzal is magyarázható, hogy a növények a kezelés ellenére is képesek voltak elegendő karotinoid bioszintézisére, mellyel szintén hatásosan védték a fotokémiai rendszer fehérjéit (nem fotokémiai kioltás- NPQ).

A vízvesztéssel szembeni védekező mechanizmusok egyik fajtája a különböző szerves ozmolitok (pl. prolin) sejten belüli felhalmozódása. Ezeknek az ún. kompatibilis ozmolitoknak a felhalmozása - a belső ozmotikus potenciál csökkentésével - hozzájárul a növények stressztoleranciájához: csökkenteni tudják a toxikus ionok enzimaktivitást gátló hatását, növelik az enzimek hőstabilitását, megakadályozzák az enzimkomplexek szétesését (Szabados és Savoure 2010). Az aldóz redukáz enzimek ozmoregulációban betöltött szerepét korábban már sikeresen igazolták (Oberschall et al. 2000), ezért megvizsgáltuk, vajon a túltermeltetett MsALR fehérje védő hatása a prolin felhalmozódás szabályozásában is megnyilvánul-e mindhárom stresszkezelés alatt. A cserepekről közvetlenül levágott és stressz kezelés nélkül (fitoagaron) tartott leveleken mért szabad prolin szint igazolta, hogy a tesztrendszerünk a várakozásainknak megfelelően működik, vagyis a levelek levágása és víz-fitoagaron tartása esetén nem kell számolnunk a kísérletünk során további stresszhatásokkal, melyet egyrészt a levágás is okozhatna. A dehidratált és só stresszel kezelt minták szabad prolin szintje 15-16-szoros növekedést mutatott a fitoagaron tartott levelekhez képest, azonban a MG kiváltott karbonil stressz nem okozott szignifikáns emelkedést a szabad prolin szintjében.

A prolin szint meghatározása mellett a tiobarbitúrsav reaktív származékok mennyiségének meghatározása is széles körben használt paraméter a stressz indukált lipid-peroxidáció mértékének meghatározására. Kísérleteinkben elvégzett mérések azonban azt mutatták, hogy csak a kísérlet zárónapján a citoszólos transzformáns vonalunknál mutatkozott szignifikáns különbség a malondialdehid adduktumok mérésében, míg MG kezelés esetén nem volt ez megfigyelhető. Ebből arra engedtünk következtetni, hogy figyelembe véve az MsALR enzim széles szubsztrát specifikitását (Oberschall et al. 2000) az MsALR fehérje expressziójának stressz protektív hatása az általunk vizsgált levágott, fiatal leveleken nem detektálhatók hatékonyan TBARS tesztelési eljárással.

Növények esetében a reaktív aldehidek egyik fő keletkezési helye a kloroplasztiszoban található. Itt a kettes (PSII) és egyes (PSI) fotokémiai rendszer tekinthető ezek fő képződési helyeinek (Asada 2006). Takagi et al. (2014) legújabb eredményei világosan megmutatták, hogy a kloroplasztiszok is lehetnek a MG elsődleges forráshelyei, melyek egyben a fehérje-módosító lépések fő cél organelumai is. Úgy vélték, hogy a Calvin-ciklusból származtatott MG mennyiségének aránya nőtt a megvilágítás időtartama, fény intenzitása és a CO₂ –koncentráció függvényében. Ezzel párhuzamosan a kloroplaszt fehérjék és MG közötti lehetséges reakciók száma is növekszik, amelyek különböző kémiai módosulásokon keresztül a normális fehérje funkciók folyamatokat megzavarva vezetnek az úgynevezett "növényi diabétesz"-hez (Saito et al. 2011). A termelt fehérjét a kloroplasztiszba targetáló transzformáns növényvonalaink közül a későbbi tranziens expressziós kísérleteinkhez cpL1 jelöléssel ellátott vonalunkat használtuk. Ez a transzformációs stratégia több szempontból is fontos lehet számunkra. Részint elérhetjük a fotoszintetikus apparátus stresszel szembeni jobb védelmét azáltal, hogy a detoxifikáló enzimeket (jelen esetben a reaktív aldehideket átalakító aldóz reduktázt) közvetlenül a kloroplasztiszba juttattuk, részint pedig csökkenthetjük annak a veszélyét, hogy a nagy mennyiségben termelt enzim esetleg károsan befolyásolja a növény fejlődését. Az általunk alkalmazott Rubisco kis alegység tranzit peptid szekvenciája alkalmasnak bizonyult a termelt fehérje kloroplasztiszokba targetálására, s a transzgenikus vonalaink a citoszólos transzformáns vonalakhoz hasonló erősséggel szintetizálták a fehérjét.

Az általunk végzett kísérletek mind azt igazolták, hogy az MsALR fehérjét túltermelő árpavonalaink mind ellenállóaknak bizonyultak az alkalmazott abiotikus stresszek esetében, függetlenül attól, hogy a termelt fehérjét a citoszólba, vagy a kloroplasztiszokba targetáltuk. Mindkét transzformációs megközelítés hasonló eredményeket adott, mely azzal is magyarázható, hogy az enzim természetes szubsztrátjainak (reaktív karbonil-vegyületek) képződése mindkét intracelluláris helyen előfordulhat. Az ilyen vegyületek a kloroplasztiszokban lebontásra kerülhetnek közvetlenül a PSI rendszer által, de az aldo-ketoreduktáz enzimek általi, enzimátikus úton történő lebontásuk fontossága megnövekszik a stressz, vagy rossz fényviszonyok hatására.

5.4. Árpa stabil genetikai transzformációja a GW2 gén csendesítésére

Dolgozatom következő részét a magméret meghatározásában szerepet játszó GW2 gén csendesítésére irányuló transzformációs kísérletek képezték. Ennek első lépéseként a rizs szemméret meghatározásában fontos szerepet játszó GW2 gén (mely egy E3 ubiquitin ligáz kódol) árpa homológjait kerestük meg és ezek kifejeződését csökkentettük antiszensz technológiával; a gének rövid, specifikus szakaszainak Golden Promise tavaszi árpába történő

visszatranszformálásával. Az adatbázisokban történő kereséséből megállapítottuk, hogy az ismert kétszikű szekvenciák egy csoportot alkotnak, míg az egyszikűek esetében a kétfajta homológ egymástól élesen elkülöníthető. A két csoport közötti fehérjeszintű azonosság 40% körüli, azonban ez főként a fehérjék első felére koncentrálódik, ahol az ubiquitin ligáz aktivitásért felelős RING-domén található, a szubsztrát kötésért feltehetően felelős második szakasz szekvenciája egymástól teljesen eltérő. Ebből arra következtethetünk, hogy a fehérjék élettani funkciója is jelentősen különbözhet, noha mindkét esetben a fehérje degradációs útvonal irányító enzimeiről van szó. A rizs esetében a GW2 homológ fehérje szekvenciája bizonytalan. Bár az ezt kódoló genomikus régió ismert, a predikció nem fedi a cDNS-ek által megerősített aminosavsorrendet.

A Gabonakutató Non-Profit Kft.-ben megkezdtük a növények részletes vizsgálatát (Golden Promise kontroll növények és a transzgenikus árpák 6 vonala), melyben az egyedszámok (vonalanként 18-20) megengedték a növények fenotípusos elemzését a kalászok paraméterei (fő és mellékhajtások száma, szemszám, ezerszemtömeg, szem szélesség, hosszúság) alapján. A tapasztalt fenotípusok alapján összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a rizs GW2 közeli árpa homológjának antiszenszelése (*ASHvGW2.1*) a növény vegetatív növekedési fázisában bár erőteljes fenotípust nem okozott, a kalászosítás a kontrollhoz képest előbb kezdődött (körülbelül egy héttel), azonban a kalász érésének folyamata lassúbb, hosszabb volt a teljes és viaszos érés időtartama. Feltételezéseink szerint ezzel is magyarázható a jobb szemfeltöltődés és a kialakuló nagyobb szemméret és -tömeg. Ezzel szemben a rizs GW2 távoli árpa homológjának antiszenszelése (*ASHvGW2.2*) jelentős változást eredményezett már a vegetatív növekedés fázisában is. A növény alacsonyabb, igen jelentős (80 %-os) levéltömeg és az azt eredményező levélméret növekedéssel. A kalászosítás legalább egy hét késéssel indult meg a kontrollhoz képest, a kalászok gyakorlatilag a teljes érés során levélfedettek voltak. Különbséget tapasztaltunk a fő- és mellékhajtások számában is, illetve az ezekről származó szemek méreteiben is. Az *ASHvGW2.2* homológ esetében kevesebb főhajtás és több mellékhajtás volt megfigyelhető, tehát a bokrosodás is erőteljesebb mértékű volt. Mindkettő homológ esetében egyaránt növekedett a mellékhajtásonként mért ezerszemtömegek nagysága. Ez elsősorban a szemek szélesebb voltának, valamint ebből adódó nagyobb tömegükkel voltak magyarázhatóak a transzformánsok esetében, ehhez a szemhosszúságban mért csekély változások voltak feljegyezhetőek a kontroll növényeken mért szemekhez képest. Ez összhangban van az irodalomban fellelhető eredményekkel is. Song és mtsai. (2007) a GW2 gén térkepezésen alapuló azonosítását és klónozását végezték el. A szerzők a gént fordított, antiszensz orientációban (AS) fejeztették ki ciszgenikus növényekben, ahol a gén elhallgattatása növelte a rizsszemek szélességét, szensz (S) orientációban történő alkalmazása pedig a szemméret csökkenését

eredményezte. Két homozigóta, közel izogén vonal összehasonlításából kiderült, hogy a mutáns *GW2* allél a rizs szemek szélességének jelentős növekedésével szignifikánsan megnövelte a szemtermés súlyát, mely a szem vastagságában és hosszában bekövetkezett enyhe növekedéssel párosult.

Az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy ezek az ubiquitin ligázok alapvető meghatározói lehetnek a vegetatív-generatív fázisok közötti átváltásnak. A gén szemméretet befolyásoló markerként történő alkalmazhatóságának különböző szemméretekkel rendelkező rozs, triticales double haploid (DH) populációkon történő vizsgálata egy további kutatómunka tárgyát képezheti. Igen érdekes lehet még a fenotípusok elemzése kétszikűekben is, mivel jelentős hatásuk lehet a biomassza mennyiségének meghatározásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A szárazföldi növények helyhez kötött életmódjuk miatt ki vannak téve az állandóan változó külső környezetből érkező hatásoknak, biotiku és abiotikus stresszfaktoroknak. Jelenleg világszerte és hazánkban is a szárazság stressz az egyik legjelentősebb termés korlátozó abiotikus stressztényező a gabonafélék, így az árpa esetében is.

A nemesítés sikeressége nagymértékben függ attól is, hogy a meglévő természetes genetikai variabilitás milyen értékes információval szolgálhat a szárazságtűrésben résztvevő gének funkcióját illetően. Egyes gabonafajták, pl. rizs esetében már publikált eredmények is mutatták, hogy a stressz toleráns és stressz érzékeny fajták eltérő aldo-keto reduktáz génexpresszióval rendelkeznek. Munkánk során így arra szerettünk volna választ kapni, hogy a szárazságtűrő árpa genotípusok esetében tudunk-e hasonló irányvonalat kimutatni, illetve meg tudjuk-e adni ennek az esetleges különbözőségnek a genomikai hátterét. Ehhez kapcsolódóan az árpa 2 saját génjének (*Hordeum vulgare* L. aldóz reduktáz homológ 1 „*HvARH1*” és *Hordeum vulgare* L. 6-os számmal jelzett stresszre reagáló gén „*HvSRG6*”) szárazságtűrésében betöltött szerepét vizsgáltuk expressziós analízisek segítségével a Törjék Ottó munkacsoportja által korábban már különböző haplotípus csoportokba sorolt, szárazságtűrés szempontjából variábilis árpa genotípusokon.

Mindkét génjelölt esetében, a gének ABA kezelés hatására adott expressziós változásait vizsgáltuk. A *HvARH1* gén esetében az irodalomban fellelhető kísérleti eredmények szerint a gén kifejeződése fejlődés specifikus és hormonregulált: az abszcizinsav (ABA) serkenti, a gibberellinsav pedig gátolja a gén expresszióját. A vizsgált árpa genotípusaink 3 fő haplotípusba (*HvARH1-Z1*, *HvARH1-Z4* és a *HvARH1-Z6*) voltak csoportosíthatóak, közöttük lévő legfontosabb eltérés a promóter régióban felfedezhető 6 bp hosszúságú deléció (a *Z4* és *Z6* haplotípus csoportokon belül), illetve a *Z1* haplotípus csoport esetében a promóter régióban elhelyezkedő 9 bp hosszú inszerció volt. Mindhárom haplotípus csoporton belül 3-3 genotípusban vizsgáltuk az inszerció-deléció mutációk hatását az ABA-indukált génexpressziós változásokban. Az alkalmazott ABA kezelés hatására minden esetben erőteljes gén indukciót tapasztaltunk. A legkifejezettebb, s egyben az adott haplotípuson belül a leginkább egyöntetűbb változást a *HvARH1-Z1* haplotípusban tapasztaltunk (20-60-szoros növekedés). A *Z4* és *Z6* haplotípusba tartozó tájfajták alacsonyabb, 10-szeres gén expressziós szintet produkáltak. A *Z4* haplotípushoz tartozó *Compana* genotípusban detektált kimagasló expressziós szint azonban előrevetítette a nagyobb mintaszámmal végzendő további génexpressziós vizsgálatok (statisztikai) szükségességét. Az *HvSRG6* gén esetében 5 olyan árpa genotípust vizsgáltunk, amelyek a teljes hosszúságú promóter szekvenciát tartalmazták, illetve 3 olyan

genotípust (Otis, Chilga és Diamond), melynek promóter régiója egy 197 bp nagyságú inszerciós-deléció (INDEL) mutációt tartalmazott. Az ABA kezelést hatására itt azonban csak moderált génexpressziós változást tapasztaltunk (2,7 szeres indukciótól - 0,7 szeres represszióig), de későbbi promóter analízisünk eredménye kimutatta, hogy az ABA indukció és szárazság stressz válaszhoz köthető elemek egyike sem található az adott INDEL régióban.

A génfunkciós vizsgálatok másik módja, ha a jelölt gént transzformáns növényben túltermeltetjük. Ennek érdekében a kiválasztott génekkel tavaszi árpat (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) transzformáltunk, majd vizsgáltuk a transzformáns vonalak abiotikus stressztoleranciáját, valamint a szem méretének alakulását.

Első transzformációs kísérleteink során csoportunk korábbi kutatási eredményeihez kapcsolódóan egy genetikai modellnövényből, a *Medicago sativa*-ból származó, reaktív aldehideket semlegesítő *ALR* gén (MsALR) szerepét vizsgáltuk a stressztűrésben. Ezen transzformációk során az MsALR fehérjét a citoszólba (p6d35S-MsALR) és/vagy a kloroplasztisza (p6d35s-cpMsALR) juttató árpavonalakat is előállítottunk. A konstrukciók előállításával párhuzamosan az árpa *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációs módszerét is rutimódszerré adaptáltuk laboratóriumunkban. A transzgenikus jelölt vonalak PCR analízisével igazoltuk, hogy sikerrel vittük át árpába mind a célgént, mind pedig a szelekciós markergént (*hpt*). Immunoblot analízissel nemcsak a termelt fehérje expresszióját igazoltuk, hanem bizonyítottuk, hogy a fehérje megfelelően erős mennyiségben, s az adott sejtkompartimentben (citoszól vagy kloroplasztisz) expresszálódik. Sikeresen hoztunk létre 24 független (14,3 % transzformációs hatékonyság); az MsALR fehérjét a citoszólba, és 5 független; az MsALR fehérjét a kloroplasztisza juttató transzformáns árpavonalat (4,4 % transzformációs hatékonyság). Későbbi vizsgálatokhoz kiválasztott vonalak esetében a citoszólos transzformáns vonalon a transzgén beépülési kópiaszámát is meghatároztuk. Az agrobaktériumos transzformációra jellemző alacsony kópiaszám helyett magas kópiaszámot értünk el, mely magas expressziós szintet ($14,9 \pm 2 / 11,2 \pm 0,8$ RT-PCR-rel meghatározva) bizonyítottunk.

A transzformáns árpa leveleken végzett stressztűrés kísérleteinkhez – szintén irodalmi adatok alapján – fluoreszcens fehérjék (GFP és DsRed) tranziens expresszióján alapuló tesztelési eljárást fejlesztettünk tovább, mely egyszerűen alkalmazható volt laboratóriumban végzett stresszkísérletekre. A DsRed fehérje biokémiai tulajdonságai alapján alkalmas volt arra, hogy jobban megismerjük és jellemezzük az alkalmazott stresszt a fluoreszcens fehérjéket termelő árpa epidermisz sejtekben. A vízhiányos állapot során kialakult denaturáló körülmények ugyanis csökkentették az érett DsRed mennyiségét, viszont megnőtt a vörösen fluoreszkáló sejtek aránya —csak akkor, ha a transzgenikus növény ellenállóbb volt a stressz hatással szemben. Általunk alkalmazott módozatának előnye más módszerekkel szemben, hogy egyszerűen adaptálható

számos stressz esetén is, továbbá olyan esetekben is információt nyújthat a vizsgált abiotikus stresszel szembeni tolerancia mértékére, amikor más paraméterek (például fotoszintetikus hatékonyság) még nem mutatnak detektálható különbséget. A fluoreszcens tesztelés az általunk alkalmazott dehidratációs, só (175 mM NaCl) és karbonil (12,5 mM MG) stressz során fellépő sejtszintű stresszválaszok értékelésében megfelelő módszernek bizonyult a transzformáns p6d35S-MsALR (citoszól) és p6d35S-cpMsALR (kloroplasztisz) transzformáns vonalainkon: a kiválasztott vonalaink mind a GFP/DsRED sejtarányban a vad típusú kontroll növényekhez képest szignifikánsan magasabb értékeket mutattak, s egyben az alkalmazott abiotikus stresszekkel szemben ellenállóbbnak bizonyultak. Az aldóz-reduktáz gén tehát alkalmasnak bizonyult az abiotikus stresszek hatására képződő reaktív aldehidek toxikus koncentrációjának redukciójában. Vonalaink stressztűrő képességét fluoreszcens pigmenttartalom mérésekkel is alátámasztottuk. A dehidratáció és sóstressz esetén a stressz kezelt levelek szignifikánsan magasabb klorofill mennyiséggel voltak jellemezhetőek, mert igazolta az MsALR fehérje védő hatását az alkalmazott stresszekkel szemben a fotoszintetikus apparátus megvédése által. A metilglioxállal (MG) végzett stressz kezeléseknél a transzgenikus levelek 5 %-kal több klorofill tartalmat mutattak, mely azt engedte feltételezni, hogy a detoxifikáló enzim stresszvédő hatása nemcsak a citoszólban felhalmozott fehérjék lehetséges károsodásának megelőzésében van. Karotinoid tartalom tekintetében a dehidratációs stressz kezelés után enyhe csökkenés volt megfigyelhető a transzgenikus és nem transzgenikus vonalainkon. A só és MG kezelés során megfigyeltek pedig arra engedtek következtetni, hogy növények a kezelés ellenére is képesek voltak elegendő karotinoid bioszintézisére, mellyel szintén hatásosan védték a fotokémiai rendszer fehérjéit (nem fotokémiai kioltás). Fotoszintetikus pigmenttartalom mellett prolin és tiobarbitúrsav reaktív származékok mennyiségi meghatározását is elvégeztük. Kísérleteink során mindkét transzformációs megközelítés (citoszól / kloroplasztisz) hasonló eredményeket adott, mely azzal is magyarázható, hogy az MsALR enzim természetes szubsztrátjainak (reaktív karbonil-vegyületek) képződése mindkét intracelluláris helyen előfordulhat. Mindkét transzformáns vonal esetében egymással összehasonlítható mértékű stressztoleranciát igazoltunk.

Dolgozatom következő részét a szemméret meghatározásában szerepet játszó *GW2* gén csendesítésére irányuló transzformációs kísérletek képezték. Azonosítottuk a rizs szemméret meghatározásában fontos szerepet játszó *GW2* gén árpa homológjait (2), majd antiszensz technológiával csökkentettük kifejeződésüket. Az ASHvGW2.1 konstrukció esetén összesen 13 növényt regeneráltunk, melyek a későbbi PCR analízisek során 4 független transzformáns vonalat bizonyítottak, az ASHvGW2.2 konstrukció esetében pedig mindösszesen 8 növényt regeneráltunk, melyek 2 független vonalhoz kapcsolódtak. A jelölt vonalainkon PCR analízissel generációkon át igazoltuk a célgén és a szelekciós markergén öröklődését, RT-PCR

technológiával pedig a gén kifejeződésének csökkenését. T2 generációs növényeken elvégeztük a növények részletes vizsgálatát, fenotípusos elemzését a kalászok paramétereit (fő és mellékhajtások száma, szemszám, ezerszemtömeg, szem szélesség, hosszúság) alapján. A rizs GW2 közeli árpa homológjának antiszenszelése (*ASHvGW2.1*) a növény vegetatív növekedési fázisában erőteljes fenotípust nem okozott, bár korábbi kalászos és lassúbb kalászérés volt megfigyelhető és hosszabb volt a tejes és viaszos érés időtartama, ezzel magyarázhatjuk a jobb szemfeltöltődést és a kialakuló nagyobb szemméret és –tömeget is. Ezzel szemben a rizs GW2 távoli árpa homológjának antiszenszelése (*ASHvGW2.2*) jelentős változást eredményezett már a vegetatív növekedés fázisában is. A növény alacsonyabb, igen jelentős (80 %-os) levéltömeg és az azt eredményező levélméret növekedéssel. A kalászosítás később, a kalászok gyakorlatilag a teljes érés során levélfedettek voltak. Különbséget tapasztaltunk a fő- és mellékhajtások számában is, illetve az ezekről származó szemek méreteiben is. A távoli GW2.2 homológ esetében kevesebb főhajtás és több mellékhajtás volt megfigyelhető, tehát a bokrosodás is erőteljesebb mértékű volt. Mindkettő homológ esetében egyaránt növekedett a mellékhajtásonként mért ezerszemtömegek nagysága. Ez elsősorban a szemek szélesebb voltának, valamint ebből adódó nagyobb tömegükkel voltak magyarázhatóak a transzformánsok esetében, ehhez a szemhosszúságban mért csekély változások voltak feljegyezhetőek a kontroll növényeken mért szemekhez képest. Ez összhangban van az irodalomban fellelhető eredményekkel is.

Az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy ezek az ubiquitin ligázok alapvető meghatározói lehetnek a vegetatív-generatív fázisok közötti átváltásnak. A gén szemméretet befolyásoló markerként történő alkalmazhatóságának különböző szemméretekkel rendelkező rozs, triticale double haploid (DH) populációkon történő vizsgálata egy további kutatómunka tárgyát képezheti. Igen érdekes lehet még a fenotípusok elemzése kétszikűekben is, mivel jelentős hatásuk lehet a biomassza mennyiségének meghatározásában.

7. SUMMARY

Plants are sessile organisms, so their productivity largely depends on their sensitivity against the environmental stresses. The persistent problem of the agriculture that the yield continuously changes year by year due to the actual environmental stresses. In nature, plants are exposed to a combination of biotic and abiotic stresses that limit crop yields. The pathogens and the pests belong to the former, and the alterations from the optimal in the temperature, the light and the water conditions belong to the latter. Researchers have started understanding the molecular basis of combined biotic and abiotic stress interactions in order to produce stress tolerant or high yield crop plants. Currently, drought stress is the major limiting factor - worldwide and in our country also - in the growth and production of crops cereals such as barley as well.

Also, the efficiency of the breeding could highly depend on the existing genetic variability and its contribution in drought stress tolerance. For the selection of barley genes that play role in drought tolerance and to reveal their polymorphisms, the EcoTILLING technique was applied in the research group of Ottó Törjék. The analysis of the determined genotypic-phenotypic associations allowed them to ensure the contribution of their selected genes in drought tolerance. This technology facilitated the isolation of the different haplotypes among the analyzed 96 cultivars via sequencing them. Connected to this research our aims were to demonstrate the genotype independent transcriptional response of two selected barley genes during drought conditions.

Based on the literature data the expressional responses of both candidate genes were investigated during ABA treatment. The results of the published studies showed that the expression of the *HvARH1* gene is influenced by developmental and hormonal condition: the abscisic acid increases and the gibberellic acid obstructs the expression level of this gene. The investigated barley haplotypes could be clustered into three main groups: (HvARH1-Z1, HvARH1-Z4 és a HvARH1-Z6); the decisive feature was a 6 bp long deletion in their promoter sequence in the Z4 and Z6 haplotypes, and a 9 bp long insertion in the Z1 haplotype's promoter. The effect of the insertion-deletion mutations were analysed in 3 genotypes in each haplotypes, respectively. We experienced massive gene induction in all the cases during ABA treatment. The strongest and most conform induction (20-60-fold increase) was observed in the HvARH1-Z1 haplotype. The cultivars belonging to the Z4 and Z6 haplotypes showed lower, 10-fold expression increase. An extremely high value was measured in the case of a *Compana* genotype belonging to the Z4 haplotype group demonstrated the importance of individual genomic

characteristics and the necessity of the statistical analysis of data derived from multiple samples. In the case of the ABA induction of *HvSRG6* gene, 5 barley genotypes containing the full length promoter and 3 genotypes (Otis, Chilga, Diamond) containing a 197 bp long deletion in the promoter were tested. We observed only a very moderate response to ABA treatment in *HvSRG6* expression, and PlantCARE analysis of the promoter showed that none of the sequence elements responsible for ABA or drought responsive gene expression could be localized to the deleted region.

The other possible method to investigate candidate genes' function can be to overexpress them in transformed plants, so the further experiments of my thesis are based on analysis of different stable transformant barley lines. We introduced gene constructs including the selected genes overexpressed into *Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise plants, and characterized their abiotic stress tolerance and their grain size. The first genetic transformation experiment was performed using a reactive aldehyde deactivating *ALR* gene isolated from a previous model plant, *Medicago sativa*. In these experiments we produced transformed lines targeting this protein into the cytosol and the chloroplast, respectively. In parallel with the preparation of the expression cassettes, we successfully adapted the *Agrobacterium*-mediated transformational method of barley embryos to our laboratory conditions. We proved the successful transfer of the target gene and the antibiotic resistance marker gene (*hpt*) using PCR technique, and with Western blot we verified both the level and the location (cytosolic or chloroplast-targeted) of the transgene's expression. We created 24 independent lines (14,3 % transformational efficiency) with cytosolic, and 5 independent lines (4,4 % transformational efficiency) with chloroplast-targeted MsALR overexpressing barley lines. Selecting the candidate lines for the further experiments the transgene copy number was also determined in the case of the cytosol-targeted lines. Despite the characteristically low copy number of the *Agrobacterium*-mediated transformation, we experienced not only high expression, but also high copy number of the candidate gene ($14,9 \pm 2$, and $11,2 \pm 0,84$, real-time qPCR technique).

The stress tolerance experiments were carried out according to the literature's protocol using detached leaves from transformed barley plants. We improved the test system that is based on the transient expression of fluorescent proteins (GFP and DsRed). The biochemical parameters of the DsRed protein make it suitable to characterize the effect of stress conditions in the epidermic cells: the denaturing conditions that occur during water deficiency decrease the amount of the matured DsRed protein, the number of the red-fluorescent cells increases, if the transgenic plant is tolerant to the applied stress. The most important advantage of this system is that it can be adapted easily for other stresses, and, due to its sensitivity, it can give us information about the scale of the stress tolerance in difficult situations where other methods

such as photosynthetic measurements cannot provide such data. The fluorescence tests were proved to be efficient in the case of dehydration, salinity (175 mM NaCl) and carbonyl (12,5 mM MG) stress, as investigating the response to these abiotic stresses in cellular level; both for the cytosol- and the chloroplasts-targeted *MsALR* expressing transformed lines. The selected lines showed higher in the DsRed/ GFP ratio compared to the wild type, and they exhibited higher resistance to the stresses, as well. Therefore, the aldose reductase gene was proved to be efficient in the detoxification of the accumulating reactive aldehydes during diverse abiotic stresses. The stress tolerance of the transgenic lines was verified further by fluorescent pigment content measurements. In the case of dehydration and salt stress the chlorophyll content of the transgenic lines was significantly higher, which demonstrates that the overproduction of *MsALR* lead to increased stress tolerance, partially through the preservation of the photosynthetic apparatus system. During the methylglyoxal experiments we experienced 5% higher chlorophyll content which allowed us to presume that the protective role of the aldose reductase does not confine to the defense of the cytosolic proteins. In the point of the carotenoid content there was a slight decrease in both the transgenic and wild type samples. The observations we gained in the salt and MG experiments allowed us to conclude that the plants were able to produce enough carotenoids despite the treatments, wherewith they protected the proteins of their photochemical system (non-photochemical quenching). Beside the photosynthetic pigment content measurements we also determined the proline contents and the thiobarbituric acid derivatives of reactive aldehydes. We found the both of our transformational approaches (cytosolic and chloroplast-targeted *MsALR*) were equally efficient in this field. The explanation could be that the generation of the natural substrates of the aldose reductase happen in both intracellular locations; the observed stress tolerance levels were comparable to each other.

The next part of my thesis focuses to the experiments oriented to the silencing of the barley *GW2* gene, which plays role in the grain size determination. First we identified the two barley homologues of the rice *GW2*, then we decreased the amount of the transcript in transgenic plants using antisense gene silencing technology. In the case of the *ASHvGW2.1* construct we regenerated 14 plants that belonged to 4 independent transgenic lines, and in the case of the *ASHvGW2.2* construct 8 plants were regenerated from 2 independent lines. In these candidate lines we verified the transgenes' (target and marker genes) presence by PCR, and measured the decreased expression level of target genes by real-time qPCR. In the T₂ generation we performed a detailed characterization and phenotypic analysis of the most important spike parameters (number of the main and secondary shoots, seed number, 1000 seed mass, length and width of the seeds). Although the silencing of the closer homologue to the rice *GW2* (*ASHvGW2.1* construct) did not cause strong phenotypic changes in the vegetative phase, the plants produced

spikes earlier and the ripening of the seeds was significantly slower, leading to better grain-filling and larger seeds and higher yield. However, the silencing of the other homologue (ASHvGW2.2 construct) appeared to provoke remarkable changes already in the vegetative growth phase of the barley plants. The plants were shorter, but the leaves were significantly larger, and the dry weight of the leaves increased with 80% compared to the wild type. The spike production was late, the spikes were covered by the leaves in full ripening. We observed differences between the number of the main and secondary shoots, and in the seed size in the two different transformant group. In the other homologue we counted more secondary shoots, that means the tillering was more vigorous. The thousand seed weight was significantly higher in both groups, which could be explained with the increased width of the seeds, since we could measure only small differences in the seed length compared them to the wild type ones. This finding is well-harmonized with the data in the literature.

These results allow us to conclude that these ubiquitin ligases can play pivotal role during the switch from vegetative to generative phase. The analysis of the applicability of this gene as a seed size determining marker is a future aim, using independent triticales DH lines possessing different sized seeds. Also, it could be interesting to investigate this gene's expression in dicot plants due to its possible effect on biomass production.

8. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ACQUA G. (2007): Principles of plant genetics and breeding. Blackwell, Oxford, UK. 584. p
- ALSCHER R. G., ERTURK N., HEATH L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Biology*, 53: 1331-1341. p.
- APEL K., HIRT H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399. p.
- ASADA K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391–396. p.
- ASHIKARI M., SAKAKIBARA H., LIN S., YAMAMOTO T., TAKASHI T., NISHIMURA A., ANGELES E. R., QIAN Q., KITANO H., MATSUOKA M. (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309 (5735): 741–745. p.
- ASHRAF M., FOOLAD M. R. (2007): Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 206–216. p.
- BAIRD G.S., ZACHARIAS D.A., TSIEN R.Y. (2000): Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 11984–11989. p.
- BARTELS D., ENGELHARDT K., RONCARATI R., SCHNEIDER K., ROTTER M., SALAMINI F. (1991): An ABA and GA modulated gene expressed in the barley embryo encodes an aldose reductase related protein. *EMBO Journal*, 10: 1037–1043. p.
- BARTELS D., PHILLIPS J., CHANDLER J. (2007): Desiccation tolerance: gene expression, pathways, and regulation of gene expression. 115–137. p. In: JENKS M.A., WOOD A.J. (eds): *Plant Desiccation Tolerance*. Iowa: Blackwell Publishing, 311. p.
- BARTLETT J.G., ALVES S.L.C., SMEDLEY M., SNAPE J.W. & HARWOOD W.A. (2008): High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4: 1-12. p.
- BATES L.S. (1973): Rapide determination of free proline content of water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205–207. p.
- BEDNAREK J., BOULAFLOUS A., GIROUSSE C., RAVEL C., TASSY C., BARRET P., FOUAD BOUZIDI M., MOUZEYAR S. (2012): Down-regulation of the *TaGW2* gene by RNA interference results in decreased grain size and weight in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 63: 5945–5955. p.

- BEN AHMED C., BEN ROUINA B., BOUKHRIS M. (2008): Changes in water relations, photosynthetic activity and proline accumulation in one-year-old olive trees (*Olea europaea* L. cv. Chemlali) in response to NaCl salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 553–560. p.
- BEVAN M.W., FLAVELL R.B., CHILTON M.-D. (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304: 184–7. p.
- BHUTTA W. M. (2011): Antioxidant activity of enzymatic system of two different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars growing under salt stress. *Plant, Cell and Environment*, 57: 101–107. p.
- BOHAČENKO I., CHMELÍK J., PSOTA V. (2006): Determination of the contents of A- and B-starches in barley using Low Angle Laser Light Scattering. *Czech Journal of Food Sciences*, 24: 11–18. p.
- BOLOURI-MOGHADDAM M. R., LE ROY K., XIANG L., ROLLAND F., VAN DEN ENDE W. (2010): Sugar signaling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS Journal*, 277: 2022–2037. p.
- BRADFORD M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254. p.
- BRINCH-PEDERSEN H., GALILI G., KNUDSEN S., HOLM P. B. (1996): Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feed-back-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Molecular Biology*, 32: 611–620. p.
- BROWN A. D. (1990): Microbial water stress physiology: principles and perspectives. Wiley & Sons, New York. 328. p.
- BRUUN-RASMUSSEN M., MADSEN C., JESSING S., ALBRECHTSEN M. (2007): Stability of Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 1323–1331. p.
- BUCHANAN B. B., GRUISSEM W., JONES R. L. (2000): Biochemistry and molecular biology of plants. *American Society of Plant Physiologist*, Rockville, Maryland.
- BURTON R. A., COLLINS H. M., KIBBLE N. A., SMITH J. A., SHIRLEY N. J., JOBLING S. A., HENDERSON M., SINGH R. R., PETTOLINO F., WILSON S. M., BIRD A. R., TOPPING D. L., BACIC A., FINCHER G. B. (2011): Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)- β -d-glucans and alters their fine structure. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 117–135. p.

- CARCIOFI M., BLENNOW A., JENSEN S., SHAIK S., HENRIKSEN A., BULÉON A., HOLM P. B., HEBELSTRUP K. H. (2012): Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. *BMC Plant Biology*, 12: 223.
- CHANDRA BABU R., ZHANG J., BLUM A., DAVID H. T. H., WU R., NGUYEN H.T. (2004): *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science*, 166: 855–862. p.
- CHANG Q., HARTE T. M., RIKIMARU L. T., PETRASH J. M. (2003): Aldo-keto reductases as modulators of stress response. *Chemico-Biological Interactions*, 325: 143–144. p.
- CHANG Q., GRIEST T. A., HARTE T. M., PETRASH J. M. (2007): Functional studies of aldo-keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773: 321–329. p.
- CHAOUI A., MAZHOUDI S., GHORBAL M.H., EL FERJANI E. (1997): Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci*, 127: 139–147. p.
- CHAVES M. M., OLIVEIRA M. M. (2004): Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, 55 (407): 2365–2384. p.
- CHEN M., WANG Q. Y., CHENG X. G., XU Z. S., LI L. C., YE X. G., XIA L. Q., MA Y. Z. (2007): *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353: 299–305. p.
- CHO M. J., JIANG W., LEMAUX P. G. (1998): Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Science*, 138: 229–244. p.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1): 156–159. p.
- COLRAT S., LATCHE A., GUI S., PECH J. C., BOUZAYEN M., FALLOT J., ROUSTAN J. P. (1999): Purification and characterization of a NADPH-dependent aldehyde reductase from mung bean that detoxifies eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Plant Physiology*, 119: 621–626. p.
- COMAI L., YOUNG K., REYNOLDS S. H., CODOMO C., ENNS L., JOHNSON J., BURTNER C., HENIKOFF J. G., GREENE E. A., TILL B. J., HENIKOFF S. (2004):

- Efficient discovery of nucleotide polymorphisms in populations by ecotilling. *The Plant Journal*, 37: 778–786. p.
- COMINELLI E., TONELLI C. (2010): Transgenic crops coping with water scarcity. *New Biotechnology*, 295: 1–5. p.
- CONG L., ZHENG H. C., ZHANG Y. X., CHAI T. Y. (2008): Arabidopsis *DREB1A* confers high salinity tolerance and regulates the expression of GA dioxygenases in tobacco. *Plant Science*, 174: 156–64. p.
- CORNIC G. (2000): Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, 5: 187–188. p.
- CSERI A., CSERHÁTI M., VON KORFF M., NAGY B., V. HORVÁTH G., PALÁGYI A., PAUK J., DUDITS D., TÖRJÉK O. (2011): Allele mining and haplotype discovery in barley candidate genes for drought tolerance. *Euphytica*, 181 (3): 341–356. p.
- CUI X. H., HAO F. S., CHEN H., CHEN J., WANG X. C. (2008): Expression of the *Vicia faba* *VfPIP1* gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *Journal of Plant Research*, 121: 207–214. p.
- CVIKROVÁ M., GEMPERLOVÁ L., MARTINCOVÁ O., VANKOVÁ R. (2013): Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 7–15. p.
- DELAUNEY A. J., VERMA D. P. S. (1993): Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4: 215–223. p.
- DEVI S.R., CHEN X., OLIVER D.J., XIANG C.B. (2006): A novel high-throughput genetic screen for stress-responsive mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals new loci involving stress responses. *Plant Journal*, 47: 652–663. p.
- DIAMANT S., ELIAHU N., ROSENTHAL D., GOLOUBINOFF P. (2001): Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses, *The Journal Of Biological Chemistry*, 276: 39586–39591. p.
- DIKEMAN C., FAHEY G. (2006): Viscosity as related to dietary fiber: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 649–63. p.
- DING X., SCHNEIDER W., CHALUVADI S., MIAN M., NELSON R. (2006): Characterization of a Brome mosaic virus strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1229–1239. p.
- DOGAN M., TIPIRDAMAZ R., DEMIR Y. (2010): Effective salt criteria in callus-cultured tomato genotypes. *Journal of Biosciences*, 65: 613–618. p.
- DONG W.B., NOWARA D., SCHWEIZER P. (2006): Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. *Plant Cell*, 18: 3321–3331. p.

- DOUCHKOV D., NOWARA D., ZIEROLD U., SCHWEIZER P. (2005): A high-throughput gene silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18: 755- 761. p.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13–15. p.
- DUDITS D. (1999): A sejtosztódás, differenciálódás és az egyedfejlődési program szabályozásának molekuláris alapjai. 249–298. p. In: BALÁZS E., DUDITS, D. (eds.): *Molekuláris Növénybiológia. Szemelvények*. Akadémiai Kiadó, Budapest. 706. p.
- DUDITS D., CSERHÁTI M., MISKOLCZI P., HORVÁTH G. V. (2007): The growing family of plant cyclin-dependent kinases with multiple functions in cellular and developmental regulation. 1–30. p. In: INZÉ D. (ed.): *Cell Cycle Control and Plant Development, Annual Plant Reviews*. Wiley-Blackwell Publishing, UK, 32: 396. p.
- ÉVA CS., CSÓTI I., TAMÁS L. (2008): Agrobacterium mediated barley transformation. *Acta Biologica Szegediensis*. 52(1): 49–53. p.
- FAN C., XING Y., MAO H., LU T., HAN B., XU C., LI X., ZHANG Q. (2006): *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1164–1171. p.
- FEHÉR-JUHÁSZ E., MAJER P., SASS L., LANTOS CS., CSISZÁR J., TURÓCZY Z., MIHÁLY R., MAI A., HORVÁTH G. V., VASS I., DUDITS D., PAUK J. (2014): Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 663–673. p.
- FOX G. P., KELLY A. M., POULSEN D. M. E., INKERMAN P. A., HENRY R. J. (2006): Selecting for increased barley grain size. *Journal of Cereal Science*, 43 (2): 198–208. p.
- FOYER C. H., DESCOURVIERES P., KUNERT K. J. (1994): Protection against oxygen radicals - an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 17: 507–523. p.
- FOYER C. H., NOCTOR G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1056–1071. p.
- FRACHEBOUD Y., LEIPNER J. (2003): The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature, and drought stress. 125–150. p. In: DeEll J.R., Toivonen P.M.A. (eds): *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 259. p.

- FUNATSUKI H., KURODA H., KIHARA M., LAZZERI P. A., MILLER E., LORZ H., KISHINAMI I. (1995): Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 707–712. p.
- GADALETA A., GIANCASPRO A., CARDONE M.F. & BLANCO A. (2011): Real-time PCR for the detection of precise transgene copy number in durum wheat. *Cellular & molecular biology letters*, 16: 652–68. p.
- GALINSKI E. A. (1993): Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia*, 49: 487–496. p.
- GARCÍA-VALENZUELA X., GARCÍA-MOYA E., RASCÓN- CRUZ Q., HERRERA-ESTRELLA L., AGUADO-SANTACRUZ G.A. (2005): Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology*, 162: 650–661. p.
- GILL S. S., TUTEJA N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12): 909–930. p.
- GOEDEKE S., HENSEL G., KAPUSI E., GAHRTZ M., KUMLEHN J. (2007): Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. *Transgenic Plant Journal*, 1: 104–117. p.
- GOODRICH J. A., TJIAN R. (2006): Transcription: the never ending story. 3–18. p. In: MA J. (Szerk.): *Gene expression and regulation*. Beijing (China): Higher Education Press, 582 p.
- GRANDO S., MACPHERSON H. G. (2005): Food Barley: Importance, Uses and Local Knowledge. In: *Proceedings of the International Workshop on Food Barley Improvement*, 14-17 January 2002, Hammamet, Tunisia. ICARDA, Aleppo, Syria. 168. p.
- GROSS L.A., BAIRD G.S., HOFFMAN R.C., BALDRIDGE K.K., TSIEN R.Y. (2000): The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 11990–11995. p.
- GUO P., BAUM M., GRANDO S., CECCARELLI S., BAI G., LI R., VON KORFF M., VARSHNEY K. R., GRANER A., VALKOUN J. (2009): Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *The Journal of Experimental Botany*, 60 (12): 3531–3544. p.

- HANDA S, BRESSAN R. A., HANDA A. K., CARPITA N. C., HASEGAWA P. M. (1983): Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiology*, 73 (3): 834–843. p.
- HARWOOD W. A. (2012): Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *Journal of Experimental Botany*, 63 (5): 1791–1798. p.
- HARWOOD W. A., ROSS S. M., CILENTO P., SNAPE J. W. (2000): The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica*, 111: 67–76. p.
- HASSAN I. A. (2006): Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. *Photosynthetica*, 44: 312–315. p.
- HAUSMANN L, TOEPFER R (1999) Entwicklung von Plasmidvektoren. Vorträge für Pflanzenzüchtung, 45: 153–171. p.
- HEGEDŰS A., ERDEI S., JANDA T., TÓTH E., HORVÁTH G., DUDITS D. (2004): Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science*, 166: 1329–1333. p.
- HEIM R., CUBITT A.B., TSIEN R.Y. (1995): Improved Green Fluorescence. *Nature*, 373: 663–664. p.
- HENSEL G., KUMLEHN J. (2004): Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by co-culture of immature embryos with *Agrobacteria*. Chapter 3, 35-44. In: Curtis, I.S. (ed): *Transgenic crops of the world: essential protocols*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, 454. p.
- HENSEL G., VALKOV V., MIDDLEFELL-WILLIAMS J., KUMLEHN J. (2008): Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology*, 165(1): 71–82. p.
- HERNANDEZ-GARCIA C.M., BOUCHARD R.A., RUSHTON P.J., JONES M.L., CHEN X., TIMKO M.P., FINER J.J. (2010): High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) GmERF and Gmubi gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *BMC Plant Biology*, 10: 237-252. p.
- HIDEG É., NAGY T., OBERSCHALL A., DUDITS D., VASS I. (2003): Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280-320 nm) stresses. *Plant, Cell & Environment*, 26: 513–522. p.
- HIEI Y., OHTA S., KOMARI T., KUMASHIRO T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6: 271- 282. p.

- HITZ W. D., HANSON A. D. (1980): Determination of glycine betaine by pyrolysis-gas chromatography in cereals and grasses. *Phytochemistry*, 19(11):2371-2374.
- HOLM P. B., OLSEN O., SCHNORF M., BRINCH-PEDERSEN H., KNUDSEN S. (2000): Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Research*, 9: 21–32. p.
- HOLZBERG S., BROSIO P., GROSS C., POGUE G. (2002): Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant. *The Plant Journal*, 30: 315–327. p.
- HSIAO T. C. (1973): Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 519–570. p.
- JAEHNE A., BECKER D., BRETTSCHEIDER H., LOERZ H. (1994): Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 525–533. p.
- JANG J. Y., LEE S. H., RHEE J. Y., CHUNG G. C., AHN S. J., KANG H. (2007): Transgenic Arabidopsis and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Molecular Biotechnology*, 40: 280–292. p.
- JENES B., BITTENCOURT P. A. L., CSÁNYI Á., PAUK J., NAGY I., TOLDI O., BALÁZS, E. (1996): The GENEBOOSTER a new microprojectile bombardment device for genetic transformation of plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2: 42–51. p.
- JENES B., TOLDI O., BITTENCOURT P. A. L., NAGY I., CSÁNYI Á., BALÁZS E. (1997): The GENEBOOSTER™ designed and developed by Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő. *Hungarian Agricultural Research*, 6(3): 14–17. p.
- JENSEN L. G., OLSEN O., KOPS O., WOLF N., THOMSEN K. K., VONWETTSTEIN D. (1996): Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)-beta-glucanase during germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 93: 3487–9341. p.
- JIN X. L., HUANG Y. Z., ZENG F. R., ZHOU M. X., ZHAN G. P. (2009): Genotypic difference in response of peroxidase and superoxide dismutase isozymes and activities to salt stress in barley. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 1103–1109. p.
- JUNKER B., ZIMNY J., LUEHRS R., LOERZ H. (1987): Transient expression of chimaeric genes in dividing and nondividing cereal protoplasts after PEG-induced DNA uptake. *Plant Cell Reports*, 6: 329–332. p.
- KAPUSI E., HENSEL G., CORONADO M. J., BROEDERS S., MARTHE C., OTTO I., KUMLEHN J. (2013): The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. *Plant Molecular Biology*, 81:149–160. p.

- KARTHA K. K., CHIBBAR R. N., GEORGES F., LEUNG N., CASWELL K., KENDALL E., QURESHI J. (1989): Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 8: 429–432. p.
- KARUNA SREE B., RAJENDRAKUMAR C.S.V., REDDY A. R. (2000): Aldose reductase in rice (*Oryza sativa* L.): stress response and developmental specificity. *Plant Science*, 160: 149–157. p.
- KAVI KISHORE P. B., SANGAM S., AMRUTHA R. N., SRI LAXMI P., NAIDU K. R., RAO K. R. S. S., RAO S., REDDY K. J., THERIAPPAN P., SREENIVASULU N. (2005): Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake, and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88: 424–438. p.
- KHACHATOURIANS G. G., MCHUGHEN A., SCORZA R., NIP W. K., HUI Y. H. (2002): Transgenic plants and crops. Marcel Dekker Inc. New York, Basel.
- KHOLOVA J., SAIRAM R. K., MEENA R. C. (2010): Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 477–486. p.
- KIHARA M., SAEKI K., ITO K. (1998): Rapid production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by direct gene transfer to primary callus-derived protoplasts. *Plant Cell Reports*, 17: 937–940. p.
- KIHARA M., OKADA Y., KURODA H., SAEKI K., YOSHIGI N., ITO K. (2000): Improvement of β -amylase thermostability in transgenic barley seeds and transgene stability in progeny. *Molecular Breeding*, 6: 511–7. p.
- KIRNAK H., KAYA C., TAŞ I., HIGGS D. (2001): The influence of water deficit on vegetative growth, physiology, fruit yield and quality in eggplants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 27: 34–46. p.
- KLEY J., HEIL M., MUCK A., SVATOS A., BOLAND W. (2010): Isolating intact chloroplasts from small *Arabidopsis* samples for proteomic studies. *Anal Biochem*, 398: 198–202. p.
- KOLB N. A., HUNSAKER L. A., VANDER JAGT D. L. (1994): Aldose reductase catalyzed reduction of acrolein: implication in cyclophosphamide toxicity. *Molecular Pharmacology*, 45: 797–801. p.
- KONCZ C., MARTINI N., MAYERHOFER R., KONCZ-KALMAN Z., KÖRBER H., REDEI G. P., SCHELL J. (1989): High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 86 (21): 8467–8471. p.

- KNUDSEN S., MÜLLER M. (1991): Transformation of the developing barley endosperm by particle bombardment. *Planta*, 185: 330–336. p.
- KUHLMANN U., FOROUGH-WEHR B., GRANER A., WENZEL G. (1991): Improved culture system for microspores of barley to become a target from DNA uptake. *Plant Breeding*, 107: 165–168. p.
- KUMLEHN J., HENSEL G. (2009): Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breeding Science*, 59: 553–560. p.
- LABABIDI S., MEJLHEDE N., RASMUSSEN S. K., BACKES G., AL-SAID W., BAUM M., JAHOR A. (2009): Identification of barley mutants in the cultivar 'Lux' at the Dhn loci through TILLING. *Plant Breeding*, 128: 332–336. p.
- LAL S., GULYANI V., KHURANA P. (2008): Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Research*, 17: 651–663. p.
- LAWLOR D. W., CORNIC G. (2002): Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275–294. p.
- LAZZERI P. A., BRETTSCHEIDER R., LIHRS R., LORZ H. (1991): Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 437–444. p.
- LEE B. T., MURDOCH K., TOPPING J., KREIS M., JONES M. G. K. (1989): Transient expression in aleurone protoplasts isolated from developing caryopses of barley and wheat. *Plant Molecular Biology*, 13: 21–29. p.
- LENDVAI Á., PETTKÓ-SZANDTNER A., CSORDÁS-TÓTH É., MISKOLCZI P., HORVÁTH G. V., GYÖRGYÉY J., DUDITS D. (2007): Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *Journal of Experimental Botany*, 58 (7): 1663–1675. p.
- LICHTENTHALER H. K. (1998): The Stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 187–198. p.
- LI L., JIANG H. X., CAMPBELL M., BLANCO M., JANE J. L. (2008): Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: relationship between resistant starch contents and molecular structures. *Carbohydrate Polymers*, 74: 396–404. p.
- LI Q., LI L., YANG X., WARBURTON M. L., BAI G., DAI J., LI J., YAN J. (2010): Relationship, evolutionary fate and function of two maize co-orthologs of rice GW2 associated with kernel size and weight. *BMC Plant Biology*, 10: 143. p.

- LI R., GUO P., BAUMZ M., GRANDO S., CECCARELLI S. (2006): Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agricultural Sciences in China*, 5: 751–757. p.
- LIVAK K. J., SCHMITTGEN T. D. (2001): Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25: 402–408. p.
- LOBELL D. B., FIELD C. B. (2007): Global scale climate – crop yield relationships and the impacts of recent warming. *Environmental Research Letters*, 2: 014002 (7pp). [doi:10.1088/1748-9326/2/1/014002](https://doi.org/10.1088/1748-9326/2/1/014002)
- MALATRASI M., CLOSE T.J., MARMIROLI M. (2002): Identification and mapping of a putative stress response regulator gene in barley. *Plant Mol Biol*, 50: 143–152. p.
- MANOHARAN M., DAHLEEN L. S. (2002): Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Reports*, 21: 76–80. p.
- MARZIN S., MIHALY R., PAUK J., SCHWEIZER P. (2008): A transient assay system for the assessment of cellautonomous gene function in dehydration-stressed barley. *Journal of Experimental Botany*, 59: 3359–3369. p.
- MATTHEWS P. R., WANG M. B., WATERHOUSE P. M., THORNTON S., FIEG S.J., GUBLER F., JACOBSEN J. V. (2001): Marker gene elimination from transgenic barley, using co-transformation with adjacent ‘twin T-DNAs’ on a standard *Agrobacterium* transformation vector. *Molecular Breeding*, 7: 195–202. p.
- McNEIL S. D., NUCCIO M. L., HANSON A. D. (1999): Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology*, 120: 945–950. p.
- MEJLHEDE N., KYJOVSKA Z., BACKES G., BURHENNE K., RASMUSSEN S. K., JAHOR A. (2006): EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes *mlo* and *Mla* of barley. *Plant Breeding*, 125: 461–467. p.
- MELONI D. A., GULLOTA M. R., MARTINEZ C. A., OLIVA M. A. (2004): The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycine betaine accumulation in *Prosopis alba*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16: 39–46. p.
- MENDEL R. R., MUELLER B., SCHULZE J., KOLESNIKOV V., ZELENIN A. (1989): Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 31–34. p.
- MIHÁLY RÓBERT (2009): A DNS-oldat elkészítése a belövéshez, 39. p. In: *Génvadászat, stabil genetikai transzformáció árpában és búzában*. Doktori (PhD) értekezés. Szent István Egyetem. 117. p.

- MITTLER R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405–410. p.
- MORAN J. F., BECANA M., ITURBE-ORMAETXE I., FRECHILLA S., KLUCAS R. V., APARICIO-TEJO P. (1994): Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194: 346–352. p.
- MORRAN S., EINI O., PYVOVARENKO T., PARENT B., SINGH R., ISMAGUL A., ELIBY S., SHIRLEY N., LANGRIDGE P., LOPATO S. (2011): Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 230–249. p.
- MRÍZOVÁ K., HOLASKOVÁ E., ÖZ M. T., JISKROVÁ E., FRÉBORT I., GALUSZKA P. (2014): Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances*, 32: 137–157. p.
- MUNDREE S. G., WHITTAKER A., THOMSON J. A., FARRANT J. M. (2000): An aldose reductase homolog from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. *Planta*, 211: 693–700. p.
- MUNNS R., TESTER M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–681. p.
- NAIDU B. P., PALEG L. G., ASPINALL D., JENNINGS A. C., JONES G. P. (1990): Rate of imposition of water stress alters the accumulation of nitrogen-containing solutes in wheat seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17 (6): 653–664. p.
- NAGY B., MAJER P., MIHÁLY R., DUDITS D., HORVÁTH V.G. (2011): Transient and transgenic approaches: functional testing of candidate genes in barley. *Acta Biologica Szegediensis*, 55 (1): 129–133. p.
- NELSON D. E., REPETTI P. P., ADAMS T. R., CREELMAN R. A., WU J., WARNER D. C., ANSTROM D.C., BENSON R. J., CASTIGLIONI P. P., DONNARUMMO M. G., HINCHEY B. S., KUMIMOTO R. W., MASZLE D. R., CANALES R. D., KROLIKOWSKI K. A., DOTSON S. B., GUTTERSON N., RATCLIFFE O. J., HEARD J. E. (2007): Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104: 16450–16455. p.
- NEUMANN P. M. (1995): The role of cell wall adjustments in plant resistance to water deficits. *Crop Science*, 35: 1258–1266. p.
- NEVO E., FU Y.-B., PAVLICEK T., KHALIFA S., TAVASI M., BEILES A. (2012): Evolution of wild cereals during 28 years of global warming in Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109: 3412–3415. p.

- NOBRE J., DAVEY M. R., LAZZERI P. A., CANNELL M. E. (2000): Transformation of barley scutellum protoplasts: regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 19: 1000–1005. p.
- NOCTOR G., FOYER C. H. (1998): Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249–279. p.
- NOWARA D., GAY A., LACOMME C., SHAW J., RIDOUT C., DOUCHKOV D., HENSEL G., KUMLEHN J., SCHWEIZER P. (2010): HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22: 3130–3141. p.
- NUUTILA A., RITALA A., SKADSEN R., MANNONEN L., KAUPPINEN V. (1999): Expression of fungal thermotolerant endo-1,4- β -glucanase in transgenic barley seeds during germination. *Plant Molecular Biology*, 41: 777–783. p.
- OBERSCHALL A., DEÁK M., TÖRÖK K., SASS L., VASS I., KOVÁCS I., FEHÉR A., DUDITS D., HORVÁTH G. V. (2000): A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stress. *The Plant Journal*, 24: 437–446. p.
- OH S. J., KWON C. W., CHOI D. W., SONG S. I., KIM J. K. (2007): Expression of barley *HvCBF4* enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, 5: 646–656. p.
- OHNOUTKOVÁ L., ZITKA O., MRIZOVÁ K., VAŠKOVÁ J., GALUSZKA P., CERNEI N., SMEDLEY M. A., HARWOOD W. A., ADAM V., KIZEK R. (2012): Electrophoretic and chromatographic evaluation of transgenic barley expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase. *Electrophoresis*, 33: 2365–2373. p.
- OIKAWA A., RAHMAN A., YAMASHITA T., TAIRA H., KIDOU S.I. (2007): Virus-induced gene silencing of *P23k* in barley leaf reveals morphological changes involved in secondary wall formation. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2617–2625. p.
- OÑATE L., VICENTE-CARBAJOSA J., LARA P., DIAZ I., CARBONERO P. (1999): Barley *BLZ2*, a seed-specific bZIP protein that interacts with BLZ1 *in Vivo* and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (14): 9175–9182. p.
- PAKNEJAD F., NASRI M., MOGHADAM H. R. T., ZAHEDI H., ALAHMADI M. J. (2007): Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *Journal of Biological Sciences*, 7: 841–847. p.

- PÁLFI-DEIM G., GULYÁS S., CSEUZ L. (1989): Demonstration of the extent of drought resistance in winter wheat varieties and study of the proline accumulation ability of 25 cultivated species. *Acta Biologica Szegediensis*, 35 (1-4): 81–90. p.
- PANSTRUGA R. (2004): A golden shot: how ballistic single cell transformation boosts the molecular analysis of cereal-mildew interactions. *Molecular Plant Pathology*, 5: 141–148. p.
- PAPAGEORGIU G. C., MURATA N. (1995): The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynthesis Research*, 25: 243–252. p.
- PARENT B., HACHEZ C., REDONDO E., SIMONNEAU T., CHAUMONT F., TARDIEU F. (2009): Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: A Trans-Scale Approach. *Plant Physiology*, 149 (4): 2000–2012. p.
- PARIDA A. K., DAS A. B. (2005): Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324–349. p.
- PARIDA A. K., DAGAONKAR V. S., PHALAK M. S., AURANGABADKAR L. P. (2008): Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 619–627. p.
- PEPÓ P. (2010): Genetikailag módosított szervezetek létrehozása, mezőgazdasági alkalmazása. 11. fejezet, 61-73. p. In: Pepó P. (Szerk.): *Növénynevelés*. Debreceni Egyetem, Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, egyetemi jegyzet, 152. p.
- PIETERS A. J., EL SOUKI S. (2005): Effects of drought during grain filling on PS II activity in rice. *Journal of Plant Physiology*, 62: 903–911. p.
- PLIEGO C., NOWARA D., BONCIANI G., GHEORGHE D. M., XU R., SURANA P., WHIGHAM E., NETTLETON D., BOGDANOVA A. J., WISE R. P., SCHWEIZER P., BINDSCHEDLER L. V., SPANU P. D. (2013): Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 633–642. p.
- POLIDOROS A. N., SCANDALIOS J. G. (1999): Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L). *Physiologia Plantarum*, 106: 112–120. p.
- PRICE A. M., ATHERTON N. M., HENDRY G. A. F. (1989): Plants under drought stress generate activated oxygen. *Free Radical Research Communications*, 8: 61–66. p.

- QUAN R., SHANG M., ZHANG H., ZHAO Y., ZHANG J. (2004): Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves draught tolerance in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 477–486. p.
- RAI M. K., JAISWAL V. S., JAISWAL U. (2010): Regeneration of plantlets of guava (*Psidium guajava* L.) from somatic embryos developed under salt-stress condition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 1055–1062. p.
- RAPACZ M., KOS'CIELNIAK J., JURCZYK .B, ADAMSKA A, WO'JCIK M. (2010): Different patterns of physiological and molecular response to drought in seedlings of malt- and feedtype barleys (*Hordeum vulgare*). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196: 9–19. p.
- REGINA A., BIRD A., TOPPING D., BOWDEN S., FREEMAN J., BARSBY T., KOSAR-HASHEMI B., LI Z., RAHMAN S., MORELL M. (2006): High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 103: 3546–3551. p.
- REYNOLDS M. P, ORTIZ R. (2010): Adapting crops to climate changes: a summary. 1–8. p .
In: Reynolds M.P. (Szerk.): *Climate change and crop production*. Cambridge: CAB International, 292 p.
- RIECHMANN J. L., HEARD J., MARTIN G., REUBER L., JIANG C., KEDDIE J., ADAM L., PINEDA O., RATCLIFFE O. J., SAMAHA R. R., CREELMAN R., PILGRIM M., BROUN P., ZHANG J. Z., GHANDEHARI D., SHERMAN B. K., YU G. L. (2000): Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (5499): 2105–2110. p.
- RITALA A., MANNONEN L., ASPEGREN K., SALMENKALLIO-MARTTILA M., KURTEN U., HANNUS R., LOZANO J. M., TERRI T. H., KAUPPINEN V. (1993): Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 12: 435–440. p.
- RITALA A., ASPEGREN K., KURTEN U., SALMENKALLIO-MARTTILA M., MANNONEN L., HANNUS R., KAUPPINEN V., TERRI T. H., ENARI T. (1994): Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Molecular Biology*, 24: 317–325. p.
- RONCARATI R., SALAMINI F., BARTELS D. (1995): An aldose reductase homologous gene from barley: regulation and function. *The Plant Journal*, 7: 809–822. p.
- SAIBO N. J. M., LOURENCO T., OLIVEIRA M. M. (2009): Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany*, 103 (4): 609–623. p.

- SAITO R., YAMAMOTO H., MAKINO A., SUGIMOTO T., MIYAKE C. (2011): Methylglyoxal functions as Hill oxidant and stimulates the photoreduction of O₂ at photosystem I: a symptom of plant diabetes. *Plant, Cell and Environment*, 34: 1454-1464. p.
- SAKAMOTO, T., MATSUOKA, M. (2008): Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 209–214. p.
- SALMENKALLIO-MARTTILA M., ASPEGREN K., AKERMAN S., KURTEN U., MANNONEN L., RITALA A., TEERI T. H., KAUPPINEN J. (1995): Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports*, 15: 301- 304. p.
- SANFORD J. C. (1988): The biolistic process – a new concept in gene transfer and biological delivery. *Trends in Biotechnology*, 6: 229–302. p.
- SELYE H. (1956): A syndrome produced by various noxious agents. *Nature*, 138: 32–34. p.
- SESTILI F., JANNI M., DOHERTY A., BOTTICELLA E., D'OVIDIO R., MASCI S., JONES H. D., LAFIANDRA D. (2010): Increasing the amylase content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *BMC Plant Biology*, 10:144.
- SHANER N., STEINBACH P., TSIEN R. Y. (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12): 905–909. p.
- SHARP R. E., POROYKO V., HEJLEK L. G., SPOLLEN W. G., SPRINGER G. K., BOHNERT H. J., NGUYEN H. T. (2004): Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 407 (55): 2343–2351. p.
- SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. (2007): Gene networks involved in drought stress response and tolerance *Journal of Experimental Botany*, 58: 221–227. p.
- SHRESTHA A. K., NG C. S., LOPEZ-RUBIO A., BLAZEK J., GILBERT E. P., GIDLEY M. J. (2010): Enzyme resistance and structural organization in extruded high amylose maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 80: 699–710. p.
- SHRAWAT A. K., GOOD A. G. (2011): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of cereals using immature embryos. Chapter 24: 355–372. p. In: Thorpe T.A., Yeung E. C. (Eds.): *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Volume 710. Humana Press (Springer Science+Business Media, LLC).
- SILVEIRA J. A. G., VIEGAS R. A., ROCHA I. M. A., MOREIRA A. C. O. M., MOREIRA R. A., OLIVEIRA J. T. A. (2003): Proline accumulation and glutamine synthetase activity

- are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160: 115–123. p.
- SIMPSON P. J., TANTITADAPITAK C., REED A. M., MATHER O. C., BUNCE C. M., WHITE S. A., RIDE J. P. (2009): Characterization of two novel aldo-keto reductases from *Arabidopsis*: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. *Journal of Molecular Biology*, 392: 465–480. p.
- SOLTÉSZ A., SMEDLEY M., VASHEGYI I., GALIBA G., HARWOOD W., VÁGÚJFALVI A. (2013): Transgenic barley lines prove the involvement of TaCBF14 and TaCBF15 in the cold acclimation process and in frost tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 64 (7): 1849–1862. p.
- SONG P., CAI C.Q., SKOKUT M., KOSEGI B.D., PETOLINO J.F. (2002): Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERSTM-derived transgenic maize. *Plant Cell Rep*, 20: 948-954. p.
- SONG X. J., HUANG W., SHI M., ZHU M. Z., LIN H. X. (2007): A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics*, 39: 623–630. p.
- SOUPPE J., BEUDEKER R. F. (1998): Improved process for the production of alcoholic beverages using MaltSeed. US-Patent WO 9805788.
<http://www.google.com/patents/EP0915985A1?cl=en>
- SRIVASTAVA S., CHANDRA A., BHATNAGAR A., SRIVASTAVA S. K., ANSARI N. H. (1995): Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217: 741–746. p.
- SRIVASTAVA S., WATOWICH S. J., PETRASH J. M., SRIVASTAVA S. K., BHATNAGAR A. (1999): Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. *Biochemistry*, 38: 42–54. p.
- SRIVASTAVA S. K., RAMANA K. V., BHATNAGAR A. (2005): Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*, 26: 380–392. p.
- STAHL Y., COATES S., BRYCE J. H., MORRIS P. C. (2004): Antisense downregulation of the barley limit dextrinase inhibitor modulates starch granule size distribution, starch composition and amylopectin structure. *The Plant Journal*, 39: 599–611. p.

- SU Z., HAO C., WANG L., DONG Y., ZHANG X. (2011): Identification and development of a functional marker of *TaGW2* associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 211–223. p.
- SUMITHRA K., JUTUR P. P., CARMEL B. D., REDDY A. R. (2006): Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regulation*, 50: 11–22. p.
- SZABADOS L., SAVOURÉ A. (2010): Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15 (2): 89–97. p.
- SZEGLETES ZS., ERDEI L., TARI I., CSEUZ L. (2000): Accumulation of osmoprotectants in wheat cultivars of different drought tolerance. *Cereal Research Communications*, 28 (4): 403–410. p.
- SZIGETI Z. (1998): Növények és a stressz. II. kötet. 915–983. p. In: Láng F. (Ed): *Növényélettan. A növényi anyagcsere*. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest.
- TAKAGI D., INOUE H., ODAWARA M., SHIMAKAWA G., MIYAKE C. (2014): The Calvin cycle inevitably produces sugar-derived reactive carbonyl methylglyoxal during photosynthesis: a potential cause of plant diabetes. *Plant and Cell Physiology*, 55: 333–340. p.
- TAKEDA T., SUWA Y., SUZUKI M., KITANO H., UEGUCHI-TANAKA M., ASHIKARI M., MATSUOKA M., UEGUCHI C. (2003): The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *The Plant Journal*, 33(3): 513–520. p.
- TALAMÈ V., OZTURK N. Z., BOHNERT H. J., TUBEROSA R. (2007): Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *The Journal of Experimental Botany*, 58: 229–240. p.
- TEZARA W. MITCHELL V. J., DRISCOLL S. D., LAWLOR D. W. (1999): Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 40: 914–917. p.
- THE IBGS CONSORTIUM (2012): The International Barley Genome Sequencing Consortium: A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491: 711–716. p.
- THONGJUEA S., RUANJAICHON V., BRUSKIEWICH R., VANAVICHIT A. (2009): RiceGeneThresher: a web-based application for mining genes underlying QTL in rice genome. *Nucleic Acid Research*, 37: 996–1000. p.
- THORNALLEY P.J. (1996): Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology*, 27(4): 565–73. p.

- TILL B.J., REYNOLDS S.H., WEIL C., SPRINGER N., BURTNER C., YOUNG K., BOWERS E., CODOMO C.A., EENNS L. C., ODDEN A.R., GREENE E. A., COMAI L., HENIKOF S. (2004): Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biology*. 2004; 4:12. DOI:10.1186/1471-2229-4-12.
- TINGAY S., MCELROY D., KALLA R., FIEG S., WANG M., THORNTON S., BRETTELL R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal*, 11 (6): 1369–1376. p.
- TONG S., NI Z., PENG H., DONG G., SUN Q. (2007) Ectopic overexpression of wheat *TaSRG6* gene confers water stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Science*, 172: 1079–1086. p.
- TRAVELLA S., ROSS S., HARDEN J., EVERETT C., SNAPE J. & HARWOOD W. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23:780-9. p.
- TRIFONOVA A., MADSEN S., OLESEN A. (2001): *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of in vitro culture conditions. *Plant Science*, 161: 871–880. p.
- TRUSWELL A. (2002): Cereal grains and coronary heart disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56: 1–14. p.
- TSIEN R. Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 509–544. p.
- TURKAN I., DEMIRAL T. (2009): Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 67: 2–9. p.
- TURÓCZY Z., KIS P., TÖRÖK K., CSERHÁTI M., LENDVAI Á., DUDITS D., HORVÁTH V.G. (2011): Overproduction of a rice aldo–keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification. *Plant Molecular Biology*, 75: 399–412. p.
- VAN CAMP W., WILLEKENS H., BOWLER C., VAN MONTAGU M., INZÉ D., REUPOLD-POPP P., SANDERMANN H., LANGEBARTELS C. (1994): Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Journal of Biotechnology*, 12: 165–16. p.
- VANDERJAGT D. L., ROBINSON B., TAYLOR K. K., HUNSAKER L. A. (1992): Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases – aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 4364–4369. p.
- VINOCUR B., ALTMAN A. (2005): Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 123–132. p.

- WAN Y., LEMAUX P. G. (1994): Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology*, 104: 37–48. p.
- WANG R. X., HAI L., ZHANG X. Y., YOU G. X., YAN C. S., XIAO S. H. (2009): QTL mapping for grain filling rate and yield-related traits in RILs of the Chinese winter wheat population Heshangmani x Yu8679. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 313–325. p.
- WARRINGER J., ERICSON E., FERNANDEZ L., NERMAN O., BLOMBERG A. (2003): High resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 15724–15729. p.
- WEI C., QIN F., ZHU L., ZHOU W., CHEN Y., WANG Y., GU M., LIU Q. (2010a): Microstructure and ultrastructure of high-amylose rice resistant starch granules modified by antisense RNA inhibition of starch branching enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1224–1232. p.
- WEI C., XU B., QIN F., YU H., CHEN C., MENG X., ZHU L., WANG Y., GU M., LIU Q. (2010b): C-type starch from high-amylose rice resistant starch granules modified by antisense RNA inhibition of starch branching enzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7383–7388. p.
- WOLFFE, A.P. (1997): Transcription control: repressed repeats express themselves. *Current Biology*, 7: 796–798. p.
- XIA Y, NING Z, BAI G, LI R, YAN G, ET AL. (2012): Allelic variations of a Light Harvesting Chlorophyll A/B-Binding protein gene (*Lhcb1*) associated with agronomic traits in barley. *PLoS ONE*, 7(5): e37573. doi:10.1371/journal.pone.0037573
- XU C., WANG Y., YU Y., DUAN J., LIAO Z., XIONG G., MENG X., LIU G., QIAN Q., LI J. (2012): Degradation of MONOCULM 1 by APC/C^{TAD1} regulates rice tillering. *Nature Communications*, 3: 750.
- XU D., DUAN X., WANG B., HONG B., HO T. H. D., WU R. (1996): Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110: 249–257. p.
- XU W. F., SHI W. M., UEDA A., TAKABE T. (2008): Mechanisms of salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* carrying a peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley. *Pedosphere*, 18: 486–495. p.
- XU Z., ZHOU G., SHIMIZU H. (2010): Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling & Behavior*, 5: 649–654. p.
- YADAV T., KOTHARI S. L., KACHHWAHA S. (2012): Optimization of Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation and Regeneration of Transgenic Plants in Indian

- Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. BL 2). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA. 83(2): 255–264. p.
- YANG C.M., CHANG K.W., YIN M.H., HUANG H.M. (1998): Methods for determination of the chlorophylls and their derivatives. *Taiwania*, 43: 116–122. p.
- YUAN C., LI C., YAN L., JACKSON A. O., LIU Z., HAN C., YU J., LI D. (2011): A high throughput *Barley stripe mosaic virus* vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PLoS One*, 6(10):e26468.
- ZALEWSKI W., GALUSZKA P., GASPARIS S., ORCZYK W., NADOLSKA-ORCZYK A. (2010): Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1839–1851. p.
- ZHANG S., CHO M. J., KOPREK T., YUN R., BREGITZER P., LEMAUX P. G. (1999): Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Reports*, 18: 959–966. p.
- ZHANG Y., WANG Z., CHAI T., WEN Z., ZHANG H. (2008): Indian mustard aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. *Molecular Biotechnology*, 40: 1–13. p.
- ZHAO J. S., REN W., ZHI D. Y., WANG L., XIA G. M. (2007): Arabidopsis *DREB1A/CBF3* bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Reports*, 26: 1521–1528. p.
- ZHONG L., XU Y. H., WANG J. B. (2010): The effect of 5-azacytidine on wheat seedlings responses to NaCl stress. *Biologia Plantarum*, 54: 753–756. p.
- ZLATEV Z. S., YORDANOV I. T. (2004): Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 30:3-18

Interneten fellelhető szerző, vagy évszám nélküli hivatkozások:

Statisztikai Tükör (2014): A fontosabb növények vetésterülete, 2014/80, 2 oldal. Összeállította: Központi Statisztikai Hivatal, Keresőprogram: *Google*, Kulcsszavak: *vetésterület 2014*.
Lekérdezés időpontja: 2015.07.11.

<https://www.ksh.hu/docs/hun/xftp/gyor/vet/vet21405.pdf>

Statista (2015): The Statistical Portal, World barley acreage from 2008/2009 to 2014/2015 (in million hectares). Keresőprogram: *Google*, Kulcsszavak: *world, barley, hectar, acreage*.
Lekérdezés időpontja: 2015.11.03.

<http://www.statista.com/statistics/271968/barley-acreage-worldwide-since-2008/>

PlantCare adatbázis:

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

Részecskebelövő berendezés szerkezeti rajza: Keresőprogram: *Google*. Kép-keresés.
Kulcsszavak: *biolistic gene transformation, protocols, BIO-RAD PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System*. <http://www.oocities.org/eurekayao/bombgene.html>

M2. Alkalmazott primerek listája

Elnevezés	Szekvencia	Fragment hossz	Annealing °C
MsALR_BamHI_Fwd	5'- TCGGATCCCGAGATGGCCACAGCAATC -3'	996 bp	64 °C
MsALR_XhoI_His_Rev	5'- GCCTCGAGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGG -3'		
HvTP_SpeI_Fwd	5'- CGACTAGTCCATGGCCCCACC GTGATG -3'	167 bp	62 °C
HvTP_BamHI_Rev	5'- GAGGATCCTGCATGCACCTGATCCTTCCAC -3'		
PHYG_Fwd	5'- CCTGAACTCACCGCGAC -3'	532 bp	54 °C
PHYG_Rev	5'- GCTCATCGAGAGCCTGC -3'		
pUbi-AB_Fwd	5'-CCGTTCCCGCAGACGGGATCGAT -3'	424 bp + inszert	60 °C
pUbi-AB_Rev	5'- TGATAATCATCGCAAGACCGGCA -3'		
Yrg 1_120-145_Fwd	5'- GGGAGCTTTATGCCTTTTGAGCAACC - 3'	512 bp	60 °C
Yrg 1_606-631_Rev	5'- GTGTGCGTTCTACCATGAGCTTCTGC -3'		
Yrg 2_3-24_Fwd	5'- ATAGGTGCCGTGCCACCAACAC -3'	539 bp	60 °C
Yrg 2_520-541_Rev	5'- TACCGCCAAGCTAACGCTGGAG -3'		
ASHvGW2.1_BamHI_Fwd	5'- AGGGATCCGGGAGCTTTATGCCTTTTGAGCAACC -3'	528 bp	62 °C
ASHvGW2.1_SpeI_Rev	5'- CGACTAGTGTGTGCGTTCTACCATGAGCTTCTGC -3'		
ASHvGW2.2_BamHI_Fwd	5'- AGGGATCCATAGGTGCCGTGCCACCAACAC -3'	555 bp	62 °C
ASHvGW2.2_SpeI_Rev	5'- CGACTAGTTACCGCCAAGCTAACGCTGGAG -3'		
RT_18S_Fwd	5'- GTGACGGGTGACGGAGAATT -3'	151 bp	60 °C
RT_18S_Rev	5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'		
RT_HvAhr_Fwd	5'- TGGCCAACA AACTGAACAAGACCC -3'	191 bp	60 °C
RT_HvAhr_Rev	5'- GGTCAGCACACGCTTCTCATCTTT -3'		
RT_SR6_Fwd	5'- CAGATGTTCTGATGAATGGGAGTCTG -3'	66 bp	60 °C
RT_SR6_Rev	5'- AGCAGTTGCTTGCTTTTCAGCACGTA -3'		
RT_ASGW2.1_Fwd	5'- TGCAGCACATCCTATTCAGC -3'	110 bp	60 °C
RT_ASGW2.1_Rev	5'- GAATGGAAGACCGCATGTT -3'		
RT_ASGW2.2_Fwd	5'- GTTTCCTCTGTGCGTGACA -3'	111 bp	60 °C
RT_ASGW2.2_Rev	5'- TATCCCACCAGTCCCTATGC -3'		
RT_Bzip3_Fwd	5'- TTGGATGGCATCTTTGATAC -3'	165 bp	60 °C
RT_Bzip3_Rev	5'- TGGCATAGGTTGCGTATG -3'		
RT_MsALR_Fwd	5'- GGTGTTGTTGCCAAAGCTGTC -3'	151 bp	60 °C
RT_MsALR_Rev	5'- TGATCCATAACTCCTCGCGC -3'		
Szekvenáláshoz			
GH-NOS-R1	5'- GCGCGCTATATTTTGTTC -3'	557 bp + inszert	58 °C
GH-Ubi-F1	5'- TTCCGCAGACGGGATCGATCTAGG -3'		

M3. A transzformációhoz használt embrióizoláló, kalluszindukciós és növényregeneráló táptalajok összetétele

	CIM folyékony (embrióizolálás)	CIM₃ szilárd (kalluszindukció)
1. Maltóz	30,0 g / l	30,0 g / l
2. MS - 'Basalt Salt'	4,3 g / l	4,3 g / l
3. Tiamin-HCl	1,0 mg / l	1,0 mg / l
4. Prolin	0,69 g / l	0,69 g / l
5. Kazein-Hidrolizátum	1,0 g / l	1,0 g / l
6. Mio-inozitol	0,25 g / l	0,25 g / l
7. Dikamba	2,5 mg / l	2,5 mg / l
8. Cisztein	0,8 g / l	-
9. Acetosziringon	0,098 g / l	-
10. CuSO ₄	-	1,25 mg / l
11. Timentin	-	150 mg / l
12. Higromicin	-	50 mg / l
13. Fitagél	-	3 g / l
pH	5.8-5.85	5.8-5.85

K4N regeneráló táptalaj	
1. K4N Makro (20x)	50,0 ml / l
2. 75mM NaFeEDTA	1,0 ml / l
3. K-Mikro (1000x)	1,0 ml / l
4. B5 vitamin (1000x)	1,0 ml / l
5. 0,25 M Glutamin	4,0 ml / l
6. 1 M Maltóz	100,0 ml / l
7. 1 mM 6-BAP	1,0 ml / l
8. 10 mM CuSO ₄	0,49 ml / l
9. Timentin (150 mg/ml)	1,0 ml / l
10. Higromicin	25 mg / l
11. Fitagél	3 g / l

A növényregeneráló táptalaj elkészítéséhez használt makro - és mikroelem törzsoldatok felépítése

K4N Makro 20x	
NH ₄ NO ₃	6,40 g / l
KNO ₃	72,80 g / l
KH ₂ PO ₄	6,80 g / l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	8,82 g / l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	4,92 g / l
K-Mikro 1000x	
MnSO ₄ x H ₂ O	0,84 g / 100ml
H ₃ BO ₃	0,31 g / 100ml
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,72 g / 100ml
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	12,0 mg / 100ml
CuSO ₄ x 5H ₂ O	2,5 mg / 100ml
KI	17,0 mg / 100ml
CoCl ₂ x 6H ₂ O	2,4 mg / 100ml
B5 vitamin 1000x	
Tiamin-HCl	1 g / 100 ml
Nikotinsav	0.1 g / 100 ml
Piridoxin-HCl	0.1 g / 100 ml
Mezo-inozitol	10 g / 100 ml

M4. Baktérium növesztéshez használt táptalajok és tápoldatok összetétele, alkalmazott antibiotikum koncentrációk

LB (Luria-Bertrani Táptalaj):

Élesztőkivonat	5 g / liter
Trypton	10 g / liter
NaCl	5 g / liter
Agar	1,5 g / liter
pH	7,2-7,4

CPY táptalaj (LBA4404 *Agrobacterium* törzs):

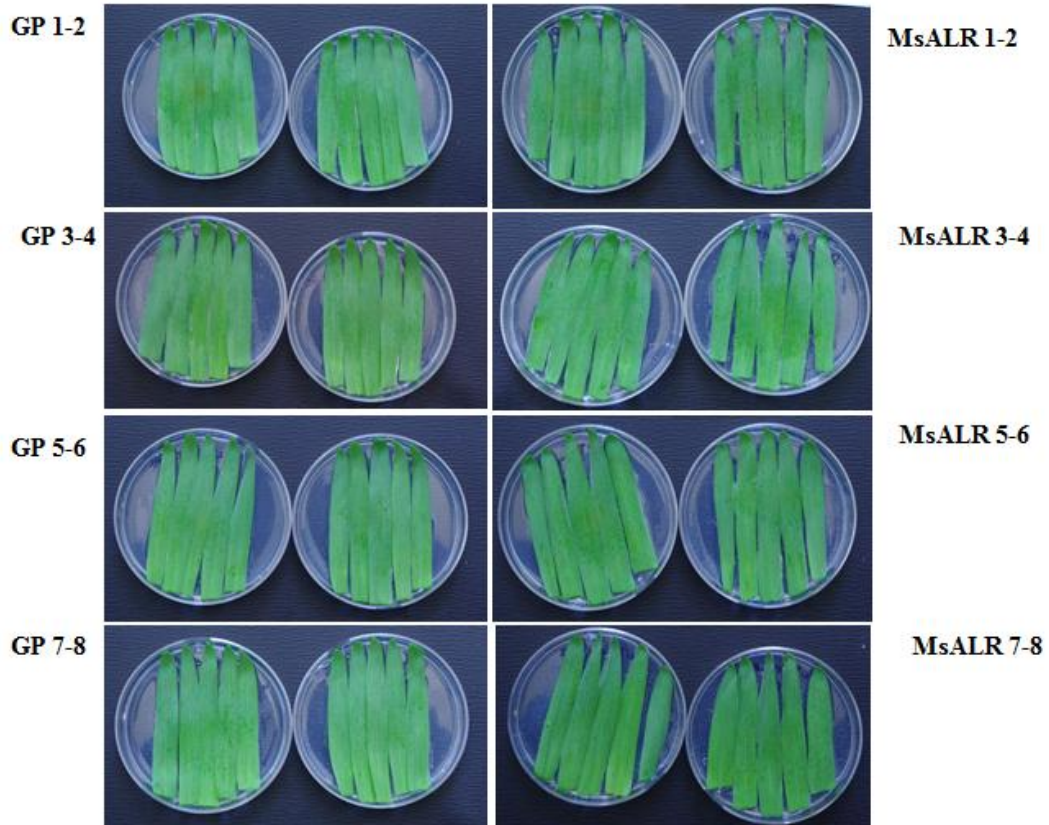
Élesztőkivonat	1 g / liter
Baktopepton	5 g / liter
Szacharóz	5 g / liter
MgSO ₄ x7 H ₂ O	1,963 g / liter
pH:	5,6

Antibiotikum végkoncentrációk:

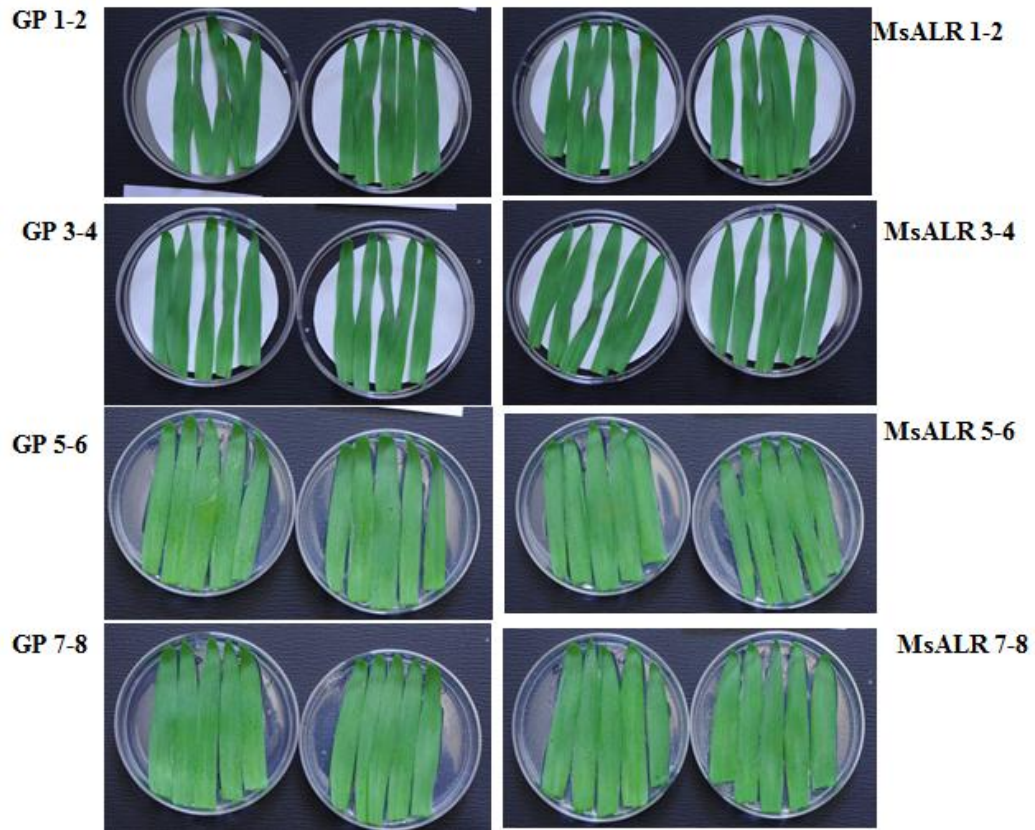
Kanamicin (<i>E.coli</i>)	50 mg/l
Karbenicillin (<i>E. coli</i>)	100 mg/l
Rifampicin (<i>Agrobacterium</i>)	50 mg/l
Streptomycin (<i>Agrobacterium</i>)	50 mg/l
Spectinomycin (<i>Agrobacterium</i>)	50 mg/l

M5. Fénykép melléklet

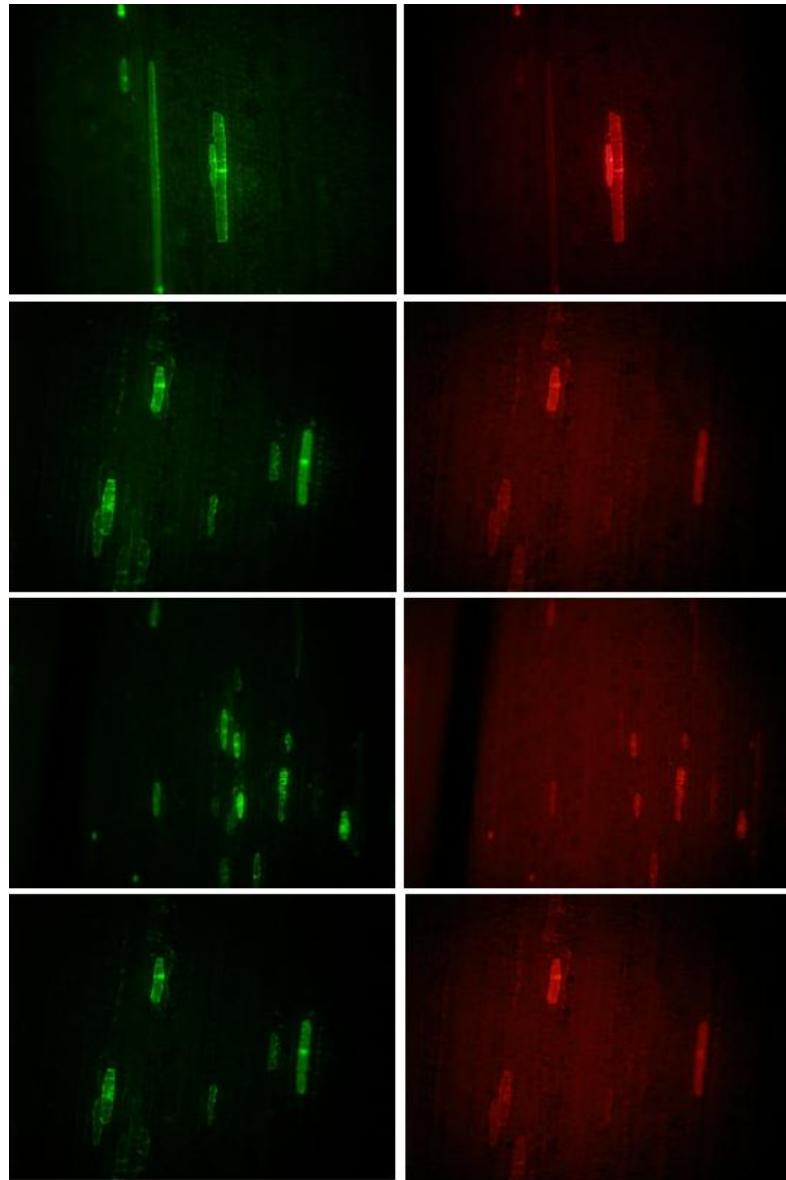
1. fénykép: Részecskebelövésen átesett levelek a belövést követő 1 nap elteltével, a GFP expresszáló sejtek mikroszkópos számlálását megelőzően:



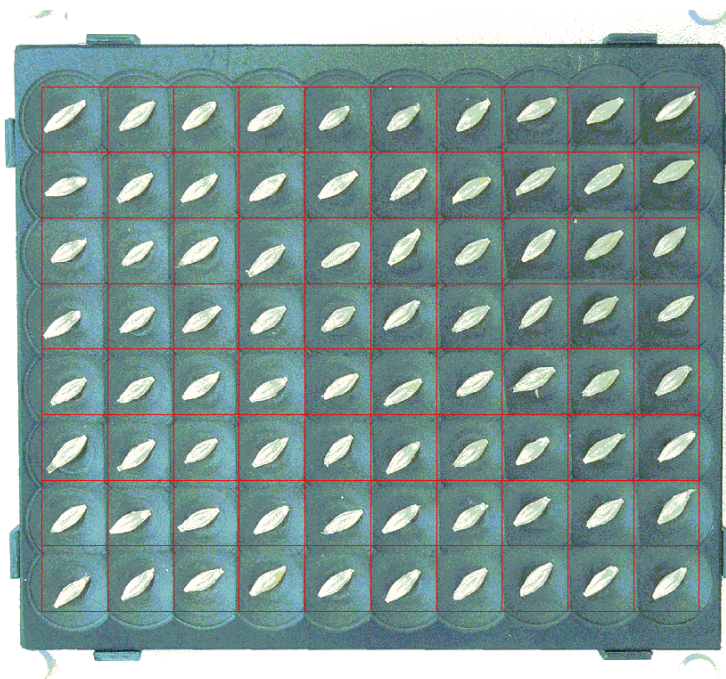
2. fénykép: A dehidratációs stressz kezelésen átesett (50 %) és a kontroll körülmények (50 %) között tartott levéldarabok képe a stressz kezelés indulásának napján:



3. fénykép: GFP és DsRED expresszáó epidermisz sejtek mikroszkópos detektálása



4. fénykép: Pixel alapú magméret meghatározáshoz készített fényképek a kiválasztott transzgenikus vonal magjairól.



22.5236	22.4272	20.3254	21.0722	16.1218	17.7418	21.5419	20.1809	19.5967	20.9457
21.7647	21.0541	20.8373	20.8192	21.5118	22.385	20.2351	20.765	22.0418	20.9698
19.6991	16.1399	22.7645	22.4453	21.036	22.1442	20.0363	20.9879	19.8496	18.9523
21.1264	19.398	20.9036	22.1502	18.6934	20.6747	21.1083	18.7174	18.2899	19.7412
20.3435	19.8737	21.1444	20.9939	19.7111	19.7292	20.2471	23.9268	19.2293	20.7891
24.4929	22.0719	17.2721	21.7527	18.1815	20.7771	19.3257	19.7473	22.0719	21.2047
20.4037	22.3248	22.0177	21.2468	21.5479	21.1023	20.0484	20.5904	22.5115	22.638
19.0667	20.6867	21.018	20.2953	19.8496	21.8792	22.6621	21.9755	19.5545	20.3435



M6. Szekvencia analízisek

A *Yrg1* és *Yrg2* gének szekvencia összehasonlítása (62.1% azonosság)

```

          10      20      30      40      50
Barley ATGGGGAACAGAATAGGAGGGAGGAGGAAG--GCCGG-GGTGGAGGAGCGGTACACGAGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley ATGGGGAACCGGGTGGGGGGGAGGCGGCGCGCGCCCGGTGGACGAGCGCTACACGCAG
      140      150      160      170      180      190
      60      70      80      90      100      110
Barley CCGCAGGGGCTGTACGAGCACAGGATATCGACCAGAAGAAGCTACGCAAGCTGATCCTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CCACAGGGGCTCTACCCGCACCCGGACATCGACCTCAAGAAGCTGCGCCGGCTCATCCTC
      200      210      220      230      240      250
      120      130      140      150      160      170
Barley GAGACCAAGCTCGCGCCCTGCTACCCGGGGGCTGACGACGCCGCGGGGGCTGACCTGGAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GAGGCCAAGCTCGCGCCCTGCCACCCGGGGGCGACGACCCCA---GGCCAGACCTCGAC
      260      270      280      290      300      310
      180      190      200      210      220      230
Barley GAGTGTCCCATCTGCTTCCTGTACTACCCAAGCCTTAACCGATCAAATGTTGCTCGAAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GAGTGCCCAATCTGCTTCCTGTTCTACCCGAGCCTCAACCGGTCAAAGTGTGCGCCAAG
      320      330      340      350      360      370
      240      250      260      270      280      290
Barley GGGATATGTACAGAGTGC TTTCTTCAAATGAAGCCA ACT-CATACTGCTCGGCCTACACA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GGGATTTGCACCGAGTGC TCTCCTCCAGATGAAGTCGCCCACATCCTGC-CGGCCGACACA
      380      390      400      410      420      430
      300      310      320      330      340      350
Barley GTGCCCATTTGCAAAAACCCCAACTATGCCGTGGAGTATCGCGGTGTAAGACAAAAGGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GTGTCCGTACTGCAAGATGCTGAATTACGCCGTGGAGTACCGCGCGCTCAAGACGAAAGA
      440      450      460      470      480      490
      360      370      380      390      400      410
Barley GGAAAGGAGCATAGAGCAATTTGAAGAACA AAAAGTCATTGAAGCACAGATGAGGATGCG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GGAGAAGGGCGTCGAGCAGATTGAGGAGCAGAGGGTGATCGAGGCGCAGATCAGGATGCG
      500      510      520      530      540      550
      420      430      440      450      460      470
Barley CCAGCAAGCACTTCAAGACGAAGAGGATAAGATGAGAAGAAAACAGAGTAGGTGCTCTTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GCATCAGGA ACTCCAGGACGACGCCGAGCGGCTCAAGAATAAGCAG-GTTGCTGCT--TC
      560      570      580      590      600
      480      490      500      510      520      530
Barley TAGCAGAACAATCGCTCCAACAACAGAAGTCAATATCGAGATATTTGCAGCACATCCTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GA-CCGATGAA--GTAACAACCGCACGAGTTGAACCCCTGCGATACCGGTGGCACATCCAC
      610      620      630      640      650      660

```

```

540      550      560      570      580      590
Barley TTCAGCGCCACCGTACCGATGTAAGCAAGAACTGAA-TGTTGTTCGTCTGAGCCTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CCCAGCCGCA----AGCGGTGCCCAAGGCAATGATGTGCCCTCATGCCAAGTACAGCATT
      670      680      690      700      710      720
      600      610      620      630      640      650
Barley CATGTTCTGCTCAGGCTAACATGCGGTCTTTCCATTCTAGGCATACTCGTGATGGTAACA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CA-GAGCTGCT-ATTGAAGAATGCCGAA----CGGTTAAGGCAGTTGCGGGATAATAATT
      730      740      750      760      770
      660      670      680      690      700      710
Barley TAGACATGAATATAGAGGACATGATGGTTATGGAAGCGATTTGGCGTTCAATTCAGGAGC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley TCGATATGGATCTTGAAGAAGTTATGCTTATGGAAGCGATTTGGCTTCTGTGCAAGATC
      780      790      800      810      820      830
      720      730      740      750      760      770
Barley AAGGAAGTATAGGAAACCCTGCTTGTGGGAGCTTTA-TGCCTTTTGAGCAAC-CAACACG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley AGGAAGCCTTAGGAAATCCAG-----GGAGCATAGGTGCCGTGCCACCAACTTCCTC
      840      850      860      870      880      890
      780      790      800      810      820      830
Barley TGAGCGGCAGGCATTCGT-TGCAGCTTCTCCTCTAGAAATACCCCATCCCGGTGGATTTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley TAAGATGCTACGATGCATCTGGGGCTACTTCAGCCGAAGCAGCCCCCCTCCCGGCGGATTCG
      900      910      920      930      940      950
      840      850      860      870      880      890
Barley CTTGTGCTGTTGCTGCTATGACTGAGCACCAGCCATCAAGCATGGATTTCTCTTACATGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CCTGCGCGGTGCGGGCTCTAGCGGAGCAACAAC--ACATGCTTGAGACC-CTTCCAGCG
      960      970      980      990      1000
      900      910      920      930      940      950
Barley CTGGTAGTAGTGCCTTCCAGTCTTTGACATGTTCCGCCGACCGTGCAA--CATTGCTGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CAGCCACTGCCAAACATCAAGACACGACATTCTCAGCAGGTCACAGAGGTCTTCACAG
      1010      1020      1030      1040      1050      1060
      960      970      980      990      1000
Barley TGGAAGCCTGCGTGCTGTGGAG-AGTTCACTAGATAGCTGGAGCGGGATAGCACCAGTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley AGGACCTAAGCATAGCCGGGAGCAGCTCCTCGGCCATCAGGGTCGAGGAACCACCATCAA
      1070      1080      1090      1100      1110      1120
      1010      1020      1030      1040      1050      1060
Barley GCACCAGAAGGAAATGGTACGAGAGGAAGGAGAGTCTCAATCGATCAC---TGGTCAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley ACAGCAGAACCACCGCAGGCAAGAGACGGCACGGATTACTCTAACAATGACGGGTGGTCAG
      1130      1140      1150      1160      1170      1180
      1070      1080      1090      1100      1110      1120
Barley AGGGTGGCGAGGCTGGGACAAGCTATGCCGGCTCGGACATCATGGCGGATGCAGGGAC--
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley ACGCGCCGAGCCAGCACCAGCTGCGCCGGCTCCGACGTCACAGTAGATGCCGGGGCCG
      1190      1200      1210      1220      1230      1240

```

```

1130      1140      1150      1160      1170      1180
Barley --AATGCCACCGTTGC--CTTTTGCTGACAATTACAGTATGGCTGCAAGCCATTTTCGCC
      : :      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CCAGTTTGGCGGCTGCTGCTGCTTCGGACGTGTCGAGCATCGGTTTCGGGCAACGT---CC
1250      1260      1270      1280      1290      1300
      1190      1200      1210      1220      1230      1240
Barley CCGAGAGCATCGAAGAACAATGATGTATTCCATGGCTGTTTCTTTAGCAGAAGCTCATG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley CCGACAGCTTTGAGGAGCAGATGATGCTGGCCATGGCGCTCTCGCTGGTTCGACGCTCGCG
1310      1320      1330      1340      1350      1360
      1250      1260      1270
Barley G--TAGAACGCACACA-CAAGGGTTGACATGGTTGTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Barley GGGTCGAGGCTCCCTCCAGCGTTAGCTTGGCGGTA
1370      1380      1390      1400

```

Protein hasonlóság (47.7% azonosság)

```

YRG1,      1  MGNRIGGRRKAG-VEERYTRPQGLYEHRDIDQKLRKLILETKLAPCPYGADDAAGADLE
YRG2,      1  MGNRVGRRRRPPVDERYTQPQGLYPHPDIDLKLRRLILEAKLAPCHPGADDPD-PDLL
      **** *  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
YRG1,      60  ECPICFLYPSLNRSKCCSKGICTEFLQMKPHTARPTQCPFKTPNYAVEYRQVKTKE
YRG2,      60  ECPICFLYPSLNRSKCCAKGICTEFLQMKSPSCRPTQCPYCKMLNYAVEYRQVKTKE
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
YRG1,      120  ERSIEQFEEQKVIEAQMRMRQALQDEEDKMRRKQSRCSSTIAPTTEVEYRDICSTSY
YRG2,      120  EKGVEQIEEQRVIEAQIRMRHQELQDDAERLKNKQVAASTDEVTTARVEP-----CDTGG
      *  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
YRG1,      180  SAPPYRCTEQETECCSSEPCSAQANMRSFHSRHRTRDGNIDMNIEDMMVMEAIWRSIQEQ
YRG2,      175  TSTPAASGAGNDVPSCQVQHSELLLKNARLRQLRDNNFMDLEEVMLMEAIWLSVQDQ
      *  *  *  *  *  *  * * * * * * * * * * * * * * * * * *
YRG1,      240  GSIGNPACGSFMPFEQPTRERQAFVAASPLEIPHPGGFSCAVAAMTEHQPSMDFSYMTG
YRG2,      235  EALGNPGSIGAVPPTLPLRCYDASGATSAEAP-PGGFACAVAALAEQQHMLGDPSSAAT
      ***  *  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
YRG1,      300  SSAFPVDFMFRPCNIAGGSLRAVESSLDSWSGIAPSGTRREMVREEGECSEI-DHWSEGA
YRG2,      294  CQTSRHDILSRQRSFTEDLSIAGSSSAIRVEEPPSNSRTPQARDGTDYSNNDGWSDA
      *  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
YRG1,      359  EAGTSYAGSDIMADAGTMP-PLPFADNYSMAASHFRPESIEEQMMYSMAVSLAEAHG
YRG2,      354  EASTSCAGSDVTVDAGAASLAAAAADVSSIGSGNVPDSFEEQMLLAMLALSLVDARG
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Dr. Horváth Gábor*-nak a munkám során nyújtott kiváló szakmai iránymutatásáért, a tanulmányaim és a kísérletek elvégzéséhez szükséges feltételek biztosításáért. Köszönöm türelmét, tanácsait és az értekezés megírásához szükséges nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönetemet fejezem ki *Prof. Dr. Dudits Dénes*-nek, hogy a *Csoportban* folyó konzorciumi munka vezetőjeként lehetővé tette, hogy a kísérleti munkákba bekapcsolódhassak. Köszönöm, hogy tanácsaival és tapasztalatainak megosztásával kutatómunkámat mindvégig figyelemmel kísérte.

Köszönettel tartozom *Dr. Jochen Kumlehn*-nek és *Dr. Goetz Hensel*-nek az árpa transzformációs vektorok biztosításáért, továbbá *Dr. Patrick Schweizer*-nek a tranziens génexpressziós tesztrendszer felállításához szükséges vektorok biztosításáért (IPK, Gatersleben, Németország).

Külön köszönettel tartozom *Dr. Pauk János* -nak és *Dr. Mihály Róbert* -nek a *Gabonakutatóban* végzett részecskebelövéses kísérleteim során nyújtott segítségükért, javaslataikért és hogy szerzőtársakként munkájukkal is hozzájárultak közös publikációink elkészüléséhez.

Köszönöm a *Sejtosztódási- és Stressz Adaptációs Csoport* (jelenleg: *Növényi Testfelépítési és Fejlődési Csoport*) valamennyi volt és jelenlegi tagjának, akik munkájukkal és ötleteikkel sokszor és sokat segítettek. Külön köszönettel tartozom *Török Károlyné*-nak asszisztensi munkájáért.

Végül, de nem utolsó sorban pedig köszönöm *Családom* minden egyes tagjának, hogy tanulmányaim során gondoskodásukkal, szeretetükkel és segítségükkel mindvégig kitartóan támogattak.